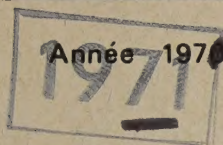


FACULTE DE MEDECINE NECKER - ENFANTS MALADES

UNIVERSITE - PARIS V



N°

127

THÈSE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'état)

par

Jean-Claude CANDE

né le 29 avril 1943 à Jonzac (Charente Maritime)

Présentée et soutenue publiquement

1971

ETUDE du
METABOLISME de la MECLORALUREE

Président: Monsieur le professeur: D.J. DUCHE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41556021_0034

FACULTE DE MEDECINE NECKER - ENFANTS MALADES

UNIVERSITE - PARIS V

Année 1970

N°

THÈSE
POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE
(Diplôme d'état)

par

Jean-Claude CANDE

né le 29 avril 1943 à Jonzac (Charente Maritime)

Présentée et soutenue publiquement

ETUDE du
METABOLISME de la MECLORALUREE

Président: Monsieur le professeur: D.J. DUCHE

FACULTÉ DE MÉDECINE WILHELM-WILHELM-MEDICAL

UNIVERSITÉ - PARIS V

1970

THÈSE

POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

(Spécialité de ...)

par

JEAN-LOUIS LAFITE

né le ... à ...

Présentée et soutenue publiquement le ...



ETUDE DE

MÉTABOLISME DE LA MÉCLONALURIE

Présentée par le Docteur en Médecine ...

A la mémoire de MA MERE

... dont rien ne me détachera.

A la mémoire de MON GRAND-PERE

A MON PERE

A MA GRAND-MERE

A MA FAMILLE

A MES AMIS

A Monsieur le Professeur D.J. DUCHE

*Médecin des Hôpitaux
Professeur de psychiatrie infantile
à la Faculté de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur*

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous a fait
en acceptant la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille trouver ici l'assurance de notre
profond respect.

A MESSIEURS LES MEMBRES DE NOTRE JURY DE THESE

A NOS MAITRES

*de la Faculté de Médecine et des Hôpitaux
de Paris*

En reconnaissance de leur enseignement.

A Monsieur le Docteur Y. TARDIEU

*Neuro-psychiatre
Ancien Chef de Clinique à la Faculté*

En remerciement de sa grande compréhension
et du chemin qu'il nous a ouvert.

Qu'il trouve ici la marque de toute notre
gratitude.

A Monsieur le Docteur A. RENARD

*Lauréat de l'Académie de Médecine
Chevalier de la Légion d'Honneur
Croix de Guerre*

Il nous a accordé son amitié, et guidé de
ses conseils avisés.

Qu'il croie en notre respectueux attachement.

*Nous sommes heureux de remercier très sincèrement le
"CENTRE D'ETUDES POUR L'INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE"
pour l'aide très importante qu'il nous a apportée.*

*Nous lui sommes gré de nous avoir accueilli en ses
Laboratoires et d'avoir mis à notre disposition son
Service de Documentation.*

*Que tous ses médecins et membres trouvent là
l'expression de nos sentiments reconnaissants.*

I N T R O D U C T I O N

Si, de nos jours, le médecin peut prescrire, avec confiance, une substance thérapeutique dans le cadre de ses indications, il nous a semblé intéressant d'essayer de percer les secrets du mécanisme d'action de ce médicament.

Longtemps, tout a paru relativement simple, et l'on se contentait d'explications qui satisfaisaient la curiosité, compte tenu des méthodes dont on disposait (4). Fabriqué avec l'étiquette de pureté, le médicament était considéré comme une flèche qui devait atteindre électivement le foyer pathologique pour le guérir. Les progrès rapides et successifs des connaissances scientifiques et technologiques dans tous les domaines, en particulier dans celui de la pharmacologie, ont conduit à modifier nombre de ces croyances et permettent maintenant de mieux approfondir le devenir des substances administrées dans un but thérapeutique.

Si certaines sont excrétées sans modification notable, les autres sont métabolisées soit totalement, soit le plus souvent partiellement (14). Les transformations possibles se situent à différents niveaux : avant l'absorption, ou au contact des liquides circulants, ou au sein même des organes et des tissus (10). Pour une substance donnée, il peut exister plusieurs voies de dégradation, plusieurs points de fixation plus ou moins transitoires. Quelques incertitudes persistent aussi au niveau des systèmes d'induction enzymatique et des mécanismes d'excrétion. Enfin, il faudra "compter" avec les impuretés - inévitables - De cela résulte la nécessité de préciser quels vont être les effets secondaires accompagnant l'effet principal du produit considéré.

Pour réaliser un bilan métabolique complet (c'est-à-dire métabolites et impuretés) d'un médicament nous disposons d'un certain nombre de méthodes telles que :

- les méthodes analytiques,
- les méthodes par les radio-isotopes,
- les méthodes histo-chimiques.

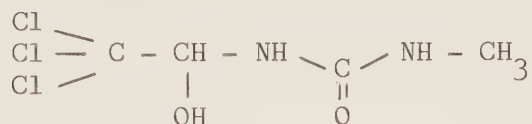
Mais certaines sont inapplicables à l'homme compte tenu d'obstacles d'ordre technique, scientifique, déontologique et même éthique. Aussi subsiste-t-il toujours un certain doute sur l'interprétation des résultats.

Nous nous proposons cependant d'exposer, ici, l'étude du métabolisme d'un corps chimique original synthétisé par :

le "Centre d'Etudes pour l'Industrie Pharmaceutique"

1'(hydroxy - 1 trichloro - 2,2,2 éthyl) - 1 méthyl - 3 urée, qui a reçu pour dénomination commune internationale le terme de MECLORALUREE, et qui, dans notre travail portera le numéro de code 75-25 C.

Sa formule développée est la suivante :



Toutefois, avant cette étude, il nous paraît utile de situer cette substance dans le cadre de la classification de Mr. DELAY qui distingue :

- 1° - Les psycholeptiques comprenant :
les hypnotiques, les neuroleptiques et les tranquillisants
- 2° - Les psychoanaleptiques
- 3° - Les psychodysleptiques.

La MECLORALUREE, suite à son expérimentation, trouve sa place dans la classe des tranquillisants, regroupés par élimination des neuroleptiques d'une part, et des hypnotiques et sédatifs d'autre part.

ETUDE IN VITRO

Nous rapportons ci-jointes les études in vitro effectuées sur le 75-25 C, en comparaison avec ses métabolites supposés.

Nous les classons à part pour la clarté de l'exposé bien que, dans le temps, elles aient été intriquées avec les études in vivo qui ont souvent orienté notre recherche.

A/ COMPORTEMENT DU 75-25 C EN MILIEU ENTERO-GASTRIQUE

Nous voulions savoir si le 75-25 C était détruit ou non dans le tube digestif, c'est-à-dire décomposé en chloral et méthylurée.

1. Protocole

Le 75-25 C et le chloral (10 mg/ml) sont mis à incuber dans les milieux gastrique et intestinal artificiels à 37° pendant 3 h.

- Milieu gastrique :	Pepsine	5 g
	HCl conc.	7 g
	Ac. lactique	2 g
	H ₂ O q.s.	1 000 ml

- Milieu "gastrique" sans enzyme : même composition sauf omission de pepsine.

- Milieu intestinal :	Pancréatine	2,8 g
	Bicarbonate de Na ..	15 g
	H ₂ O q.s.	1 000 ml

- Milieu "intestinal" sans enzyme : même composition sauf omission de pancréatine.

Une partie aliquote évaporée est déprotéinisée par l'alcool, et chromatographiée sur plaque mince.

Une autre partie aliquote est dosée par la réaction de FUJIWARA (voir en annexe).

2. Résultats

- Après incubation, le dosage de produits trichlorés indique que la quantité de chloral n'a pas changé.

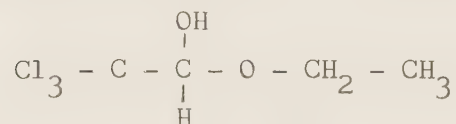
- La quantité de 75-25 C a diminué légèrement mais cette baisse est non significative.

- La chromatographie sur plaque mince montre que le milieu "gastrique" avec ou sans enzyme ne décompose pas le 75-25 C, par contre le milieu "intestinal" avec ou sans enzyme conduit à une tache faible mais visible de méthylurée.

3. Discussion

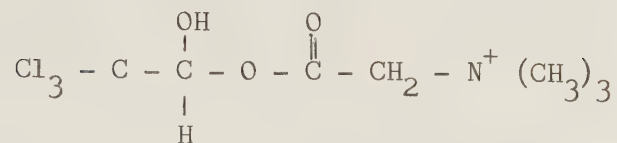
Cette différence du 75-25 C avec l'alcoolate de chloral [GESSNER et CABANA - (21)] qui se dissocie complètement dans l'eau en chloral et alcool en l'espace de 5 mn et du chloral bêtaïne qui est dit comme étant hydrolysé ou décomposé lentement dans le milieu gastrique en hydrate de chloral et produit inactif (SHARDLESS - 33) est due, a priori, à la différence des types de liaison :

dans l'alcoolate de chloral,



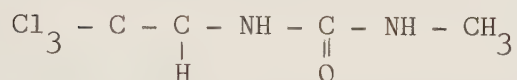
on a une liaison acétal C - O - C

et dans le chloral bêtaïne :



une liaison ester,

alors que dans le 75-25 C :



nous avons une liaison N-alkyl C-N

qui est, bien que chimiquement légèrement moins stable [énergie de liaison d'environ 50-55 Kcal./mole pour C-N contre 70-75 Kcal./mole pour C-O (FIESER - 18)]⁷, généralement plus résistante au point de vue biologique.

Pour savoir si le 75-25 C est absorbé en tant que tel dans le sang et non pas hydrolysé en chloral et méthylurée, la preuve directe serait de doser séparément dans le sang le 75-25 C. Dans l'état actuel des choses, nous ne pouvons apporter qu'une réponse indirecte.

En effet, l'expérimentation in vivo a montré, comme nous le verrons, que le chloral est très rapidement réduit en trichloroéthanol (T.C.E.) : dans le cerveau de rat, la totalité ou du moins la presque totalité y est, à tout moment, sous forme de T.C.E.

Si le 75-25 C était hydrolysé dans le milieu entéro-gastrique, le chloral formé et absorbé serait intégralement (ou presque) transformé en T.C.E., puisqu'il est administré à dose équimolaire, autrement dit, la coloration jaune du T.C.E. à la réaction de FUJIWARA serait apparente, ce qui n'était pas le cas.

D'autre part, les 2 espèces animales étudiées nous ont montré le passage rapide dans le cerveau du 75-25 C apparemment sous sa forme originale, puisque, à taux égal avec le chloral, les animaux ne dormaient pas.

B/ ETUDE DE LA TRANSFORMATION IN VITRO DU 75-25 C

1. Par différents tissus animaux et fractions subcellulaires

a) Protocole

α - Préparation des coupes de tissu et fractions subcellulaires

R A T

- Lamelles de foie :

2 g de foie sont découpés en lamelles d'environ 1 mm d'épaisseur et mis en suspension dans 5 ml de tampon phosphate à pH 7.

- Fractions subcellulaires :

la préparation de ces fractions à l'aide du rotor 30 de la Spinco L 2 - 65 est décrite en annexe.

L A P I N

- Lamelles de cerveau, de foie, de rein :

le cerveau entier, les 2 reins et environ 5 g de foie sont découpés en fines lamelles et mis en suspension dans 5 ml de tampon. 1 ml de la suspension sert de milieu enzymatique pour chaque incubation.

- Fractions subcellulaires de foie :

même remarque que pour le rat.

β - Préparation des solutions

- Substrats :

solution aqueuse de chloral à 3 mg/ml

75-25 C à 3 mg/ml

T.C.E. à 3 mg/ml

Acide trichloroacétique (T.C.A.) à
3 mg/ml

- Cofacteurs :

solution aqueuse de triphosphopyridine nucléotide

(T.P.N.) à 4,5 mg/ml

glucose - 6 - phosphate (G.6.P.) à 15 mg/ml

glutathion à 4,5 mg/ml

- Mélange d'incubation - Un mélange type :

2 ml de solution enzymatique

0,1 ml substrat

0,2 ml T.P.N.

0,2 ml G.6.P.

0,2 ml glutathion

0,3 ml eau

3,0 ml volume total.

}
}
} cofacteurs

Les mélanges sans cofacteurs sont additionnés de 0,6 ml d'eau supplémentaire pour avoir un même volume total.

γ - Incubation

Les incubations se font au bain-marie à 37° pendant 1 h.

§ - Dosage

TABLEAU I

Réaction de FUJIWARA modifiée (voir en annexe)

Produits	Coloration avant addition de benzidine	Coloration après addition de benzidine
Chloral	Violet	Rouge violacé
75-25 C	"	" "
T.C.E.	Jaune	" "
T.C.A.	Violet	" "
T.C.E.-glucuronide	Rose pâle	Rouge violacé pâle

b) Résultats

α - Rat

Dans le tableau II, la coloration avant addition de benzidine nous montre que le chloral et le 75-25 C ont été transformés en T.C.E. par les coupes de foie de rat. Mais il s'agit là d'essais in vitro qui, s'ils montrent la possibilité pour le 75-25 C de se transformer en chloral, ne préjugent pas sous quelle forme agit le 75-25 C.

Sur les 100 μ g de départ, 40 à 70 % ont été déshalogénés.

Il n'y a apparemment pas de formation de glucuronide, au contraire, l'hydrolyse entraîne une augmentation de la déshalogénation (sauf pour T.C.A.).

Le tableau III montre, compte tenu de la contamination par le surnageant résiduel des fractions mitochondriales et microsomales, que seule la fraction surnageante S₁₀₀ est active et, parmi les 4 produits essayés, seuls le chloral et le 75-25 C ont été transformés (d'après la coloration avant addition de benzidine).

Alors que la transformation du chloral en T.C.E. est sensiblement totale, la 1/2 de 75-25 C est déshalogénée, ce qui semble montrer un comportement métabolique différent.

Il n'y a pas eu de formation de glucuronide.

TABLEAU II

Foie (coupes)

Rat

Produits mis en incubation	Coloration avant addition de benzidine	Avant hydrolyse $\mu\text{g/ml}^{\text{★}}$	Après hydrolyse $\mu\text{g/ml}^{\text{±}}$
Chloral	Jaunâtre	60	32
75-25 C	"	32	9
T.C.E.	"	50	32
T.C.A.	Violet	28,5	34

Incubation en présence de cofacteurs (voir texte)

[★] Concentration initiale : 100 $\mu\text{g/ml}$.

TABLEAU III

Foie - Fractions subcellulaires

Rat

	Coloration avant addition de benzidine	Avant hydrolyse $\mu\text{g/ml}^*$	Après hydrolyse enzymatique $\mu\text{g/ml}^*$
<u>Surnageant</u>			
S ₁₀₀			
Chloral	Jaune franc	108	90
75-25 C	" "	52	62
T.C.E.	" "	96	80
T.C.A.	Violet	95	115
<u>Mitochondries</u>			
Chloral	Violet	107	103
75-25 C	"	84	83
T.C.E.	Jaune	95	98
T.C.A.	Violet	92	99
<u>Microsomes</u>			
Chloral	Violet	106	106
75-25 C	"	84	86
T.C.E.	Jaune	94	96
T.C.A.	Violet	86	99

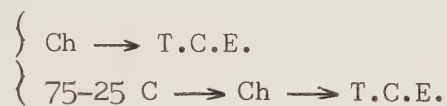
Incubation en présence de cofacteurs (voir texte).

*Concentration initiale : 100 $\mu\text{g/ml}$.

β - Lapin

Dans nos conditions opératoires, le foie et le rein sont plus actifs que le cerveau (tableau IV) :

- tant au point de vue transformation



- qu'au point de vue déshalogénéation $\left\{ \begin{array}{l} \text{du Ch} \\ \text{et du 75-25 C} \end{array} \right.$

Le rein est aussi actif que le foie dans les 2 activités.

Il n'y a eu formation de glucuronide dans aucun des tissus examinés.

Le tableau V montre que, avec les mêmes remarques que pour le rat, seule la fraction surnageante S_{100} a une activité bien nette et l'influence des cofacteurs est sensible en ce qui concerne la déshalogénéation.

Il n'y a pas eu formation de glucuronide.

TABLEAU IV

Activité de différents organes

Lapin

	Coloration avant addition de benzidine	Avant hydrolyse µg/ml**	Après hydrolyse µg/ml**
<u>CERVEAU</u>			
Chloral	Rose	81,5	72
Chloral + cofacteurs*	Rose	59	52
75-25 C	Rose	55	41
75-25 C + cofacteurs*	Rose	55	54
<u>FOIE</u>			
Chloral	Jaune + (rose)	42	44
Chloral + cofacteurs*	Jaune	30	21
75-25 C	Jaune + (rose)	33,5	27
75-25 C + cofacteurs*	Jaune	24,5	32
<u>REIN</u>			
Chloral	Jaune + (rose)	44,5	40,5
Chloral + cofacteurs*	Jaune	30,5	35,5
75-25 C	Jaune + (rose)	34	38
75-25 C + cofacteurs*	Jaune	26	30

*Cofacteurs (voir texte).

**Concentration initiale : 100 µg/ml.

TABLEAU V

Foie - Fractions subcellulaires

Lapin

	Coloration avant addition de benzidine	Avant hydrolyse $\mu\text{g/ml}^{**}$	Après hydrolyse $\mu\text{g/ml}^{**}$
<u>Surnageant S₁₀₀</u>			
Chloral	Rose	102	76
Chloral + cofacteurs [*]	Jaune	83	93
75-25 C	Rose	68,5	62
75-25 C + cofacteurs [*]	Jaune	55	59
<u>Mitochondries</u>			
Chloral	Violet	82	
Chloral + cofacteurs [*]	"	104	
75-25 C	"	74,4	
75-25 C + cofacteurs [*]	"	72,8	
<u>Microsomes</u>			
Chloral	Violet	88,8	
Chloral + cofacteurs [*]	"	102,4	
75-25 C	"	82	
75-25 C + cofacteurs [*]	"	82,8	

^{*}Cofacteurs (voir texte).

^{**}Concentration initiale : 100 $\mu\text{g/ml}$.

2. Par incubation en présence de sang humain

a) Incubation dans l'hémoglobine humaine

Un millilitre du culot de centrifugation d'un sang hépariné est additionné d'un égal volume de solution de NaCl hypotonique.

Ces 2 ml sont mis à incuber avec 2 ml de solution de produit chloré (à 100 µg/ml). Après 60 minutes, 2 ml d'acide sulfosalicylique à 3 %.

Le dosage se fait sur un ml de surnageant.

Le contrôle est obtenu par addition d'acide sulfosalicylique immédiatement après celle du produit.

TABLEAU VI

Produits	Contrôle		Incubation	
	D.O.	Conc. µg/ml*	D.O.	Conc. µg/ml*
75-25 C	0,585	27,2	0,580	27
Chloral	0,800	32,5	0,790	32
T.C.E.	0,430	30,6	0,430	30,6
T.C.A.	0,500	17	0,460	16

Les concentrations sont lues sur les gammes respectives du produit mis en incubation.

* Concentration du milieu : 33 µg/ml.

b) Incubation dans le sérum humain

Nous avons fait 2 séries d'incubations.

Dans l'une, le dosage des produits polychlorés est fait sur le mélange total sans défécation. La comparaison avec le contrôle correspondant donne l'activité déshalogénante du sérum.

Dans l'autre série, le dosage se fait après défécation à l'acide sulfosalicylique. La comparaison avec le contrôle correspondant donne l'activité déshalogénante du sérum également et la comparaison des 2 contrôles (avec et sans défécation à l'acide sulfosalicylique) nous donne la quantité de produits polychlorés liés au précipité à l'acide sulfosalicylique.

- Solution de substrat chloré : 1 mg/ml

- Mélange d'incubation : 1 ml de sérum

0,1 ml de solution de substrat

- Incubation à 37° pendant 1 h.

Dans la 2ème série : défécation à l'acide sulfosalicylique à 3 % : 1 ml.

Les contrôles : même composition que pour les mélanges d'incubation avec toutefois la précaution suivante : l'addition de pyridine + NaOH pour la 1ère série ou celle d'acide sulfosalicylique pour la 2ème série suit immédiatement le mélange sérum + substrat.

TABLEAU VII

	1ère série Sans défécation µg/ml*	2ème série Après défécation µg/ml*	Différence due à la défécation µg/ml
<u>Incubation</u>			
Chloral	6	2	4
75-25 C	6,5	0	6,5
T.C.E.	28,5	26,5	2
T.C.A.	31	19	12
<u>Contrôle</u>			
Chloral	39	32	7
75-25 C	33,5	25	8,5
T.C.E.	35	28	7
T.C.A.	32	17,5	14,5

*Concentration lue sur les gammes respectives faites dans le plasma de lapin, concentration initiale théorique : 50 µg/ml.

3. Discussion

Cette série d'incubation in vitro nous a permis de montrer que le 75-25 C se transforme jusqu'en T.C.E. dans la fraction surnageante S₁₀₀.

Nous ne sommes toutefois pas arrivés à montrer la formation de T.C.E.-glucuronide (acide urochloralique). De même, nous n'avons pas localisé la formation de l'acide trichloroacétique; mais si nous nous référons à COOPER J.R. et FRIEDMAN P.J. (19) l'enzyme d'oxydation du chloral en T.C.A. se trouve également dans la fraction surnageante.

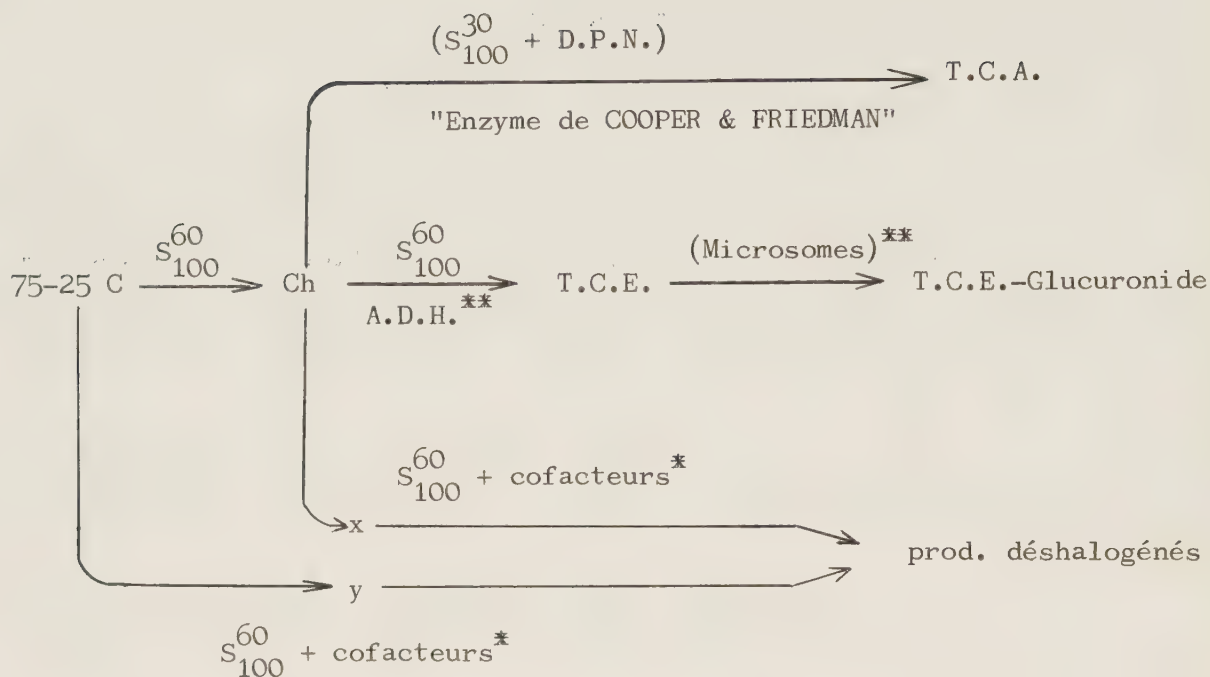
Cette enzyme isolée et partiellement purifiée présente la caractéristique particulière de ne pas présenter de substrat naturel*.

Le métabolisme déshalogénant que nous examinerons plus en détail ci-après est également localisé dans la fraction surnageante S₁₀₀.

Tous ces résultats sont schématisés dans la figure I.

*Celui-ci semble être différent du système d'enzymes nommé Enzymes Métabolisant les Médicaments (E.M.M.) qui sont microsomaux.

Figure I



*cofacteurs = $\begin{cases} \text{glutathion} \\ \text{G. 6. P. (glucose-6-phosphate)} \\ \text{T. P. N. (triphosphopyridine nucléotide)} \end{cases}$

**d'après la littérature

S_{100}^{30} fraction surnageante à 105 000 g et 30 mn.

S_{100}^{60} fraction surnageante à 105 000 g et 60 mn (lapin, rat)

A.D.H. alcool déshydrogénase

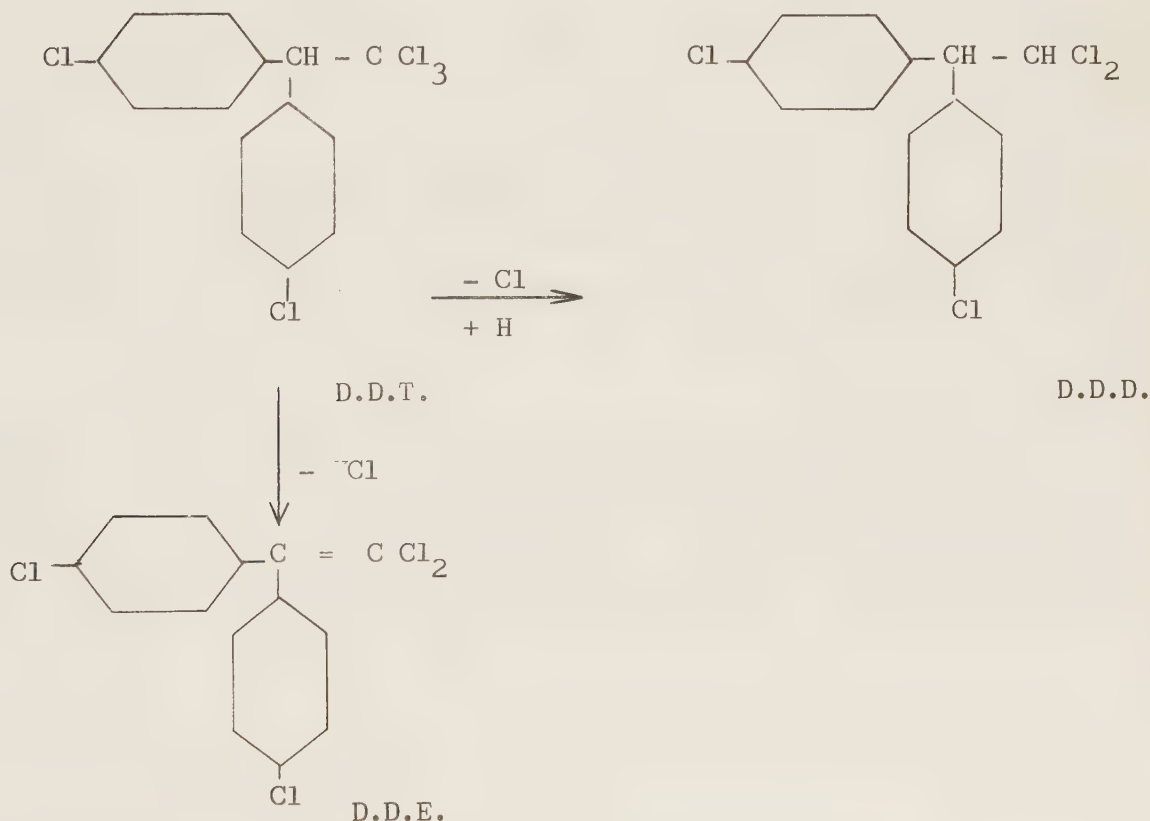
x, y produits intermédiaires.

Localisation intracellulaire du métabolisme du 75-25 C.

Déshalogénation

Le groupement trichlorométhyl - (Cl₃ C-) est doué d'une bonne stabilité chimique. Toutefois, dans certaines conditions même relativement douces, il est possible d'enlever un atome de chlore. Le chloral donne, par traitement par le cyanure de sodium à 50-60° pendant 2 h, de l'acide dichloroacétique (ROSENBLUM - 32).

Parmi les produits connus et contenant le groupe trichlorométhyl, la déshalogénation non enzymatique a été montrée pour le D.D.T. [1.1.1. trichloro-2.2-bis (p-chlorophényl) éthane] par D.J. ECOBICHON et P.W. SASCHENBRECKER (16) dans du sang congelé. Il s'agirait d'une réaction purement chimique d'oxydo-réduction catalysée par les coenzymes réduites, les porphyrines et autres métalloprotéines.



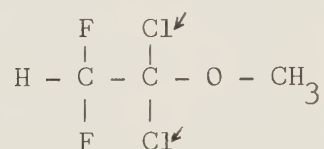
D.D.D. : 1.1. dichloro-2.2 bis (p-chlorophényl) éthane

D.D.E. : 1.1. dichloro-2.2 bis (p-chlorophényl) éthylène.

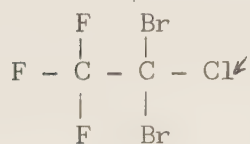
La déshalogénation par extraits tissulaires du chloral (BRAY et al. - 5) a été décrite et citée par COOPER et FRIEDMAN (20).

La déshalogénation des produits dichlorés et monochlorés a été montrée par Van DYKE et al. (35). A l'aide de produits marqués au Cl^{-36} et C^{-14} , ils ont prouvé que la déchloruration a eu lieu, par incubation avec des tranches de foie de rat (et plus spécifiquement avec les microsomes) avec :

le méthoxyflurane (1.1. difluoro-2.2 dichloroéthyl-méthyl-éther)



et l'halothane (1.1.1. trifluoro-2.2 bromo-chloro-éthane)



Nos résultats présents montrent que les tissus de rat et de lapin sont capables de déshalogéner le 75-25 C, le T.C.A., le T.C.E. et le chloral. Le foie et les reins sont plus actifs que la cervelle en ce qui concerne le lapin.

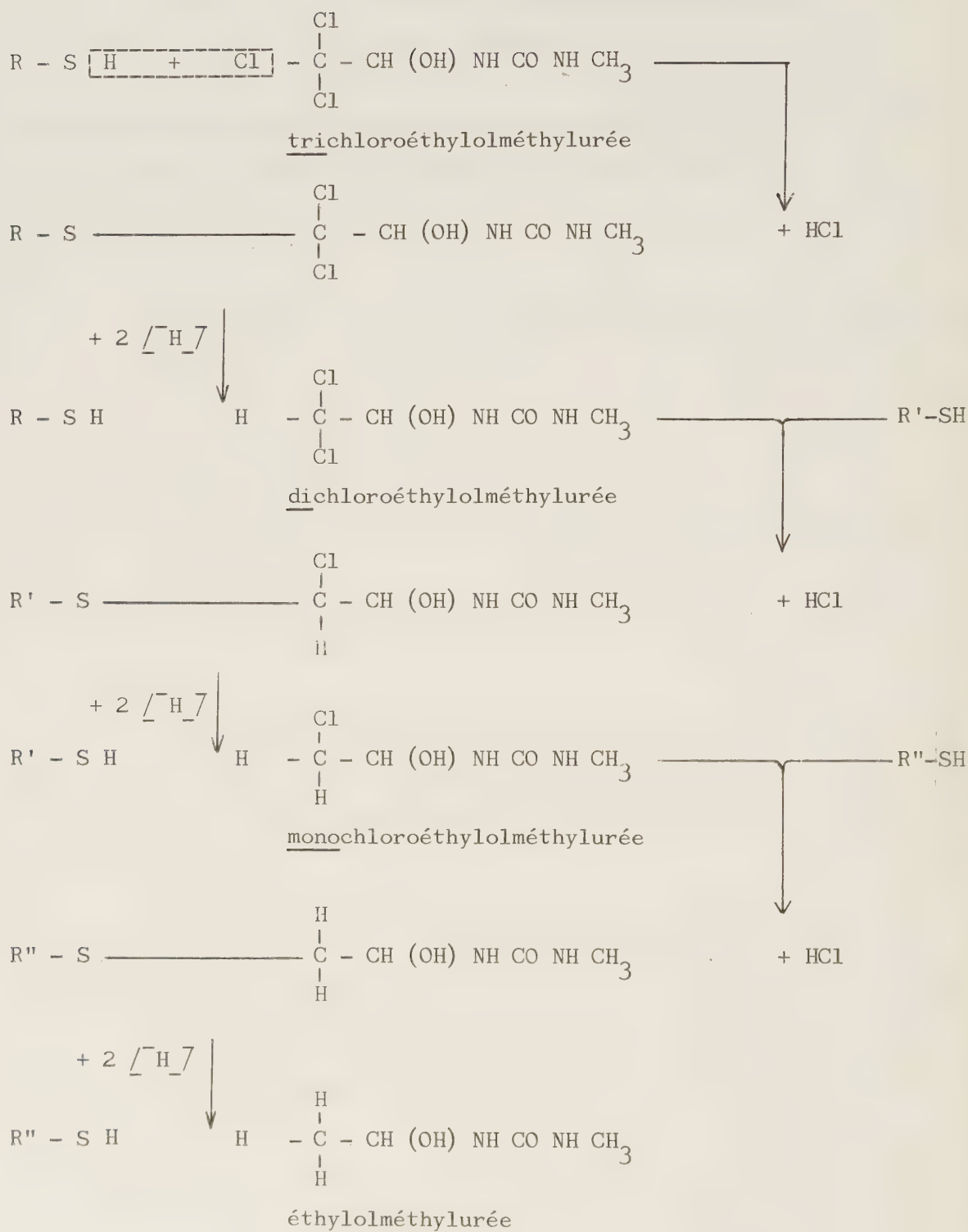
Le mécanisme d'une telle déshalogénation est inconnu. En présence des composants sanguins, la déshalogénation semble être absente avec l'hémoglobine, autrement dit il n'y a pas eu de déshalogénation purement chimique, non enzymatique du type décrit pour le D.D.T. par ECOBICHON et SASCHENBRECKER (16).

La déshalogénéation a eu lieu plutôt avec des composants du sérum et l'influence des cofacteurs nous fait penser que le glutathion pourrait être la substance modèle de ce qui se passerait dans l'organisme.

On peut imaginer en 1ère hypothèse un processus de déshalogénéation du type de la figure II avec pour R - SH :

R = aminoacyl - ou polypeptide.

Figure II



Mécanisme hypothétique de déchloruration du 75-25 C

Dans nos expériences in vitro :

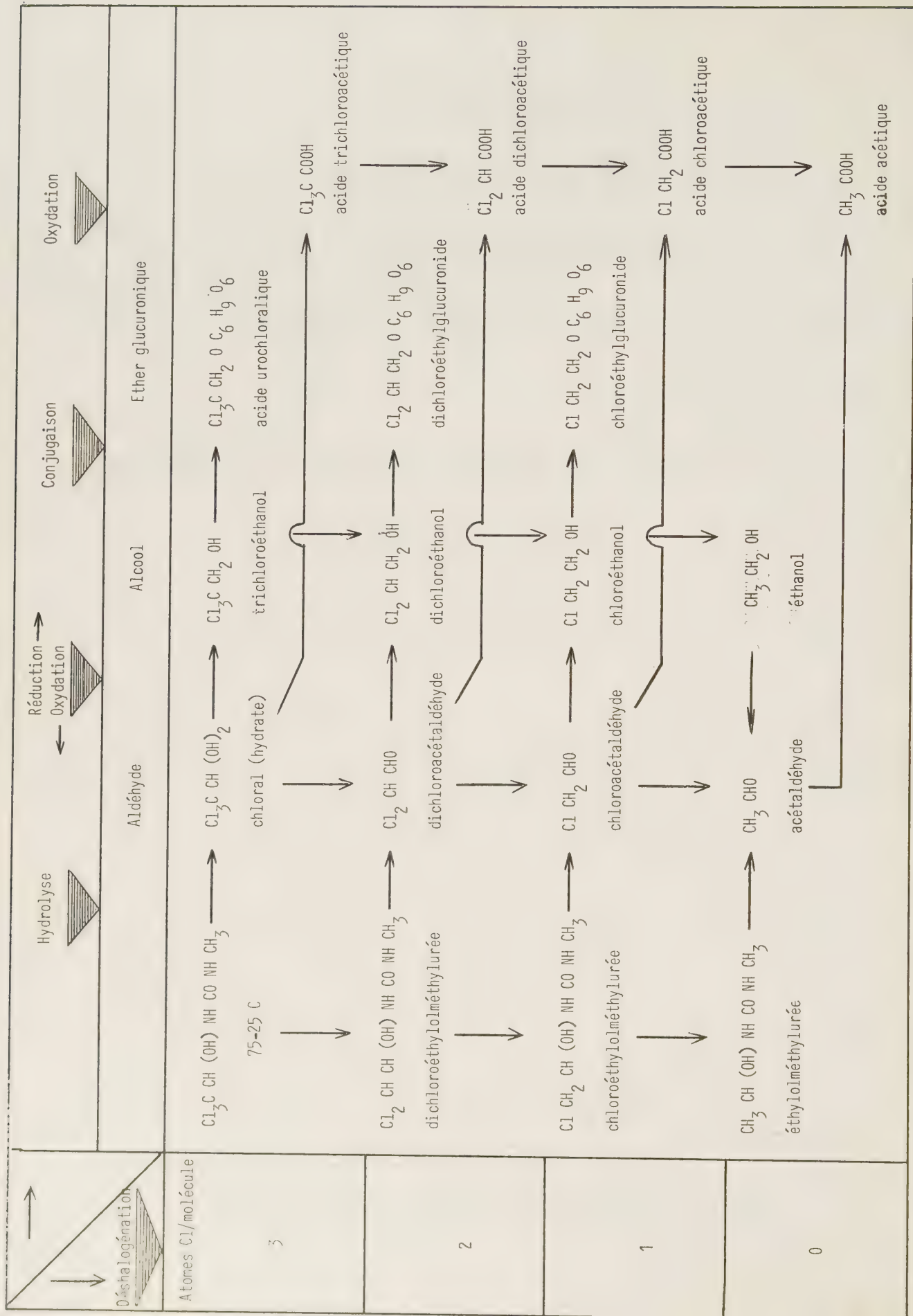
R - SH : glutathion réduit

2 $[^-\text{H}]$: hydrogènes actifs sont fournis par le T.P.N.H. qui est lui-même régénéré in situ par T.P.N. + G. 6. P. en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase de la préparation enzymatique.

In vivo :

R R' et R'' peuvent être identiques ou différents.

Figure III



En résumé

Nous démontrons dans ce chapitre que :

- le foie et les reins sont les organes très actifs du métabolisme du 75-25 C ;

- la transformation du 75-25 C peut se faire en T.C.E. et a lieu dans la fraction surnageante S_{100} ;

- la déshalogénéation du 75-25 C a lieu également dans la fraction surnageante S_{100} et les cofacteurs T.P.N. + G. 6. P. et glutathion réduit ont une influence sensible sur cette voie métabolique ;

- le sérum humain exerce une action déshalogénante notable sur le chloral et le 75-25 C et non sur le T.C.E. et T.C.A. alors que l'hémoglobine n'a pas d'action ;

- subsidiairement, on peut déduire, de l'expérience avec le sérum et l'hémoglobine humains, l'existence des liaisons avec le précipité à l'acide sulfosalicylique beaucoup plus fortes pour le T.C.A. que pour les autres produits polychlorés ;

- au point de vue biochimique, la déshalogénéation qui s'est avérée être la voie de transformation in vitro la plus importante, indique qu'une telle voie est à considérer in vivo et que l'existence de fortes liaisons T.C.A. - X peut expliquer son élimination retardée ;

- au point de vue pharmacologique, la déshalogénéation pourrait offrir la voie de détoxification in vivo puisqu'en absence de toute excrétion, le fragment trichloroéthyl conduit finalement au chlorure et à l'acide acétique, produits physiologiques normaux.

C/ ETUDE DES LIAISONS MEDICAMENTS-PROTEINES PAR LA METHODE DE DIALYSE
A L'EQUILIBRE /DAVIS - (11)7

1. Principe de la méthode

Dans deux compartiments séparés par une membrane semi-perméable, on met dans l'un le médicament à étudier et dans l'autre une protéine telle que l'albumine.

On laisse diffuser le médicament le temps nécessaire pour que l'équilibre soit atteint. A ce moment, on dose le produit des 2 côtés du compartiment.

Dans notre étude du métabolisme du 75-25 C, il nous est utile de connaître non seulement la liaison 75-25 C-protéine, mais également celles des métabolites tels que chloral, trichloroéthanol et acide trichloro-acétique.

Leur dosage se fait par la modification de la méthode de FUJIWARA habituelle.

2. Protocole

a) Matériel

- Albumine : human serum albumine fraction V (Nutritional Biochemical Corp.)
Masse moléculaire 69 000.
- 75-25 C : masse moléculaire 221,5.
- Chloral (hydrate) : masse moléculaire 165,6.
- Trichloroéthanol : masse moléculaire 149,5.
- Acide trichloroacétique : masse moléculaire 163,5.

- Tampon : mélange à parties égales de :

1-solution de Na Cl 18 g/l

2-solution phosphate 0,04 M pH 7,4

Boyau de dialyse, diamètre $\neq$ 1 cm (Union Carbide corp.).

b) Mode opératoire

On prépare : - une solution d'albumine à 1×10^{-3} M

- des solutions de produits à $0,5 \times 10^{-3}$ M

$0,25 \times 10^{-3}$ M

$0,125 \times 10^{-3}$ M

$0,062 \times 10^{-3}$ M

Les boyaux sont lavés à l'eau distillée et mis à tremper 2 - 3 h dans du tampon. Ils sont remplis d'après le protocole indiqué ci-après, mis dans des tubes à essais contenant un égal volume de solution donnée.

On ajoute une goutte de toluène* dans chaque tube. Après bouchage, on les met sur la secoueuse mécanique à la température ambiante (25 - 27°) pendant environ 24 h.

*Des expériences préliminaires ont montré que le toluène ne gêne pas notre dosage et surtout ne perturbe pas l'équilibre et il est d'une réelle efficacité contre la pollution.

Protocole de remplissage des tubes

N° du tube	Intérieur du boyau	Extérieur
1	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M produit chloré	Tampon
2	Tampon	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M produit chloré
3	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M albumine	$0,5 \cdot 10^{-3}$ M " "
4	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M "	$0,25 \cdot 10^{-3}$ M " "
5	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M "	$0,25 \cdot 10^{-3}$ M " "
6	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M "	$0,125 \cdot 10^{-3}$ M " "
7	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M "	$0,125 \cdot 10^{-3}$ M " "
8	$1,0 \cdot 10^{-3}$ M "	$0,062 \cdot 10^{-3}$ M " "

Les 2 premiers tubes servent à s'assurer que l'équilibre a été effectivement atteint.

De même on s'assurera qu'il n'y a pas eu de fuite de l'albumine à l'extérieur du boyau par le dosage des protéines d'après la méthode de LOWRY et al. (26).

A 0,2 ml de la solution à l'extérieur du boyau, on ajoute 1,0 ml de la solution III.

Solution III : $\left. \begin{array}{l} 1 \text{ ml solution II} \\ 50 \text{ ml solution I} \end{array} \right\} \text{mélange juste avant l'emploi}$

Solution II : 0,5 % CuSO_4 , 5 H_2O dans du tartrate de K à 1 %.

Solution I : 2 % Na_2CO_3 dans NaOH 0,1 N.

Après 10 minutes, on additionne 0,1 ml de réactif de Folin.

On agite vigoureusement et après repos de 30 mn, on lit à

7 500 Å.

3. Résultats

Les tableaux VIII, IX, X et XI donnent les résultats de l'adsorption du 75-25 C, du chloral, du T.C.E. et du T.C.A.

La concentration initiale est celle mise en expérience par pesée.

La concentration "efficace" totale est la somme des concentrations à l'intérieur et à l'extérieur du boyau après dialyse.

L'adsorption par le tube de dialyse est la différence entre la concentration initiale et la concentration "efficace" totale.

Ces résultats sont rassemblés dans la figure IV.

On constate que les liaisons Médicaments-Albumine sont presque linéairement proportionnelles à la concentration à l'intérieur du boyau à l'équilibre.

TABLEAU VIII

a) 75-25 C

N° du tube	Concen- tration initiale µg/ml	Concentration après dialyse		Adsorption par tube de dialyse	Concen- tration "efficace" totale	Liaison avec l'albumine	
		Intérieur du boyau	Extérieur du boyau			µg/ml	Moyenne µg/ml
1	110	36,5	39	34,5	75,5		
2	110	38	37,5	34,5	75,5		
3	110	44,5	31	34,5	75,5	13,5	13,5
4	55	22,5	14,5	18,5	36,5	8,0	6
5	55	20,5	16	18,5	36,5	3,5	
6	27,5	12	7,5	8,0	19,5	4,5	4,2
7	27,5	12	8	7,5	20	4	
8	13,75	5,5	5	3,25	10,5	0,5	0,5

TABLEAU IX

b) Chloral

N° du tube	Concen- tration initiale µg/ml	Concentration après dialyse		Adsorption par le boyau	Concen- tration "efficace" totale	Liaison avec l'albumine	
		Intérieur du boyau	Extérieur du boyau			µg/ml	Moyenne µg/ml
1	82	49	44,5	-	93,5		
2	82	52	49	-	101		
3	82	57	39	-	96	18	18
4	41	26,5	17,5	-	44	9	10
5	41	27,5	16,5	-	44	11	
6	20	13,5	7	-	20,5	6,5	5,5
7	20	12,5	8	-	20,5	4,5	

TABLEAU X

c) T.C.E.

N° du tube	Concen- tration initiale µg/ml	Concentration après dialyse		Adsorption par le boyau	Concen- tration "efficace" totale	Liaison avec l'albumine	
		Intérieur du boyau	Extérieur du boyau			µg/ml	Moyenne µg/ml
1	74	33	36,5	4,5	69,5		
2	74	38	35	1	73		
3	74	42,5	25	6,5	67,5	17,5	17,5
4	37	26	15	-	41	11	} 12
5	37	26	13	-	39	13	
6	18	13	6,5	-	19,5	6,5	} 6,5
7	18	13	6,5	-	19,5	6,5	

TABLEAU XI

d) T.C.A.

N° du tube	Concen- tration initiale µg/ml	Concentration après dialyse		Adsorption par le tube de dialyse	Concen- tration "efficace" totale	Liaison avec l'albumine	
		Intérieur du boyau	Extérieur du boyau			µg/ml	Moyenne µg/ml
1	80	35,5	37	7,5	72,5		
2	80	35	40,5	4,5	75,5		
3	80	67	13	0	80	54	} 55,2
4	80	68	11,5	0,5	79,5	56,5	
5	40	32,5	5	2,5	37,5	27,5	} 24,2
6	40	30	9	1	39	21	
7	20	15,5	1,5	3	17	14	14

Liaison avec l'albumine
 $\mu\text{g/ml}$

Figure IV

Dialyse à l'équilibre

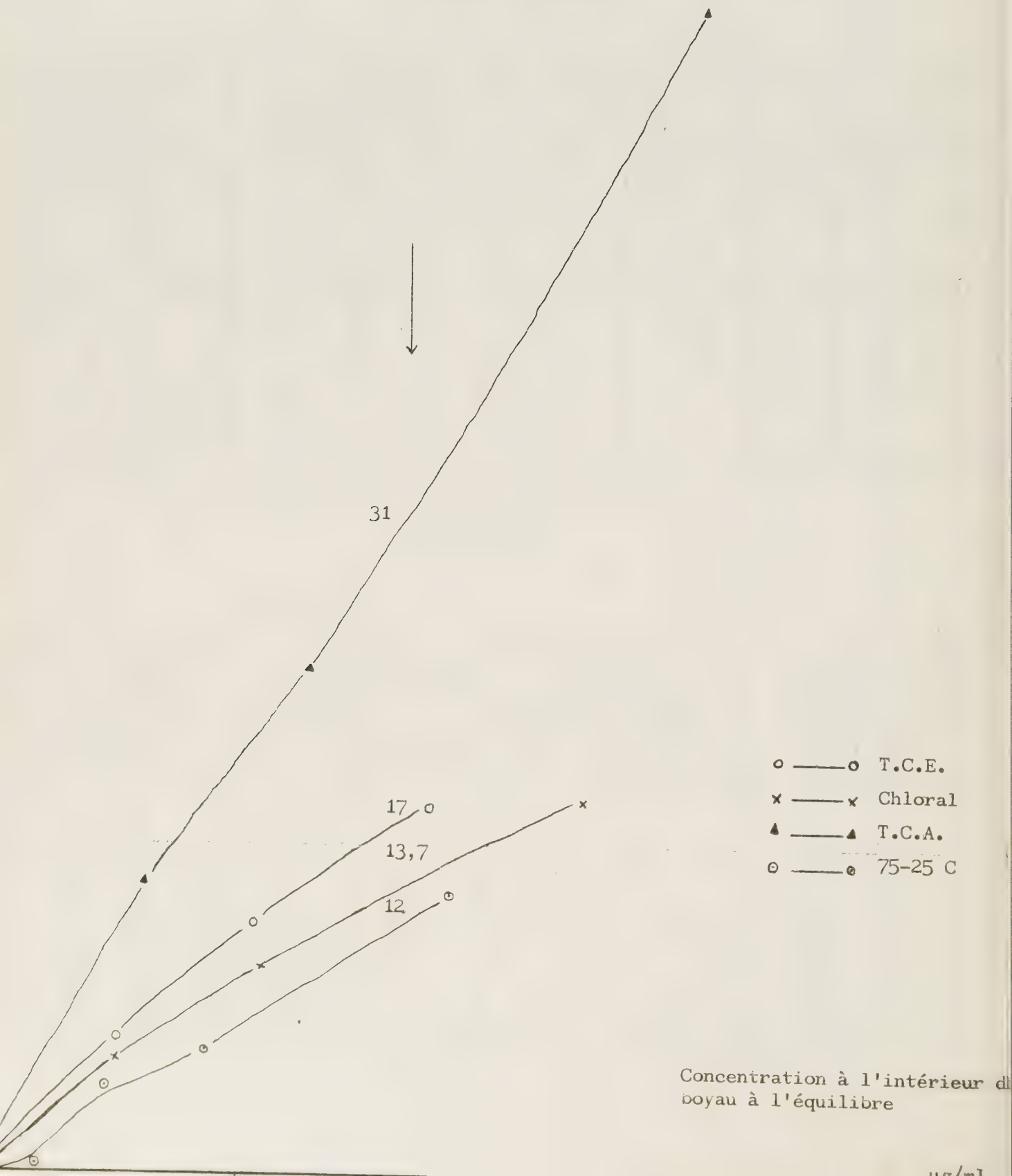


TABLEAU XII

Produits	γ de produit lié pour 40 γ de départ	Nombre de molécules pour 100 mol. d'albumine	Nombre de liaisons si liaison 75-25 C = 1
75-25 C	12	5,4	1
Chloral	13,7	8,2	1,5
T.C.E.	17	11,3	2,1
T.C.A.	31	19	3,5

Le tableau XII indique en γ ou en nombre de molécules, les proportions relatives de liaison des différents produits pour une concentration de départ de 40 γ /ml (concentration plasmatique moyenne chez l'homme après 5 jours de traitement).

4. Conclusion

Nous avons donc confirmation de l'importance de la liaison aux protéines du T.C.A. par rapport aux autres molécules qui seront donc plus facilement métabolisées.

D/ ACTION DU 75-25 C ET DU CHLORAL SUR L'OXYDATION DU D.P.N.H.

D'après SUND H. et THEORELL H. (34), l'hydrate de chloral est métabolisé par l'alcool déshydrogénasè (A.D.H.) de foie de cheval avec une constante $K_m = 1,4 \cdot 10^{-3}$.

FRIEDMAN P.J. et COOPER J.R. (20) ont montré que l'alcool déshydrogénase de foie du rat métabolise l'acétaldéhyde 12 fois plus vite que le chloral et que toute l'activité se trouve dans la fraction surnageante S_{100} , aussi nous avons commencé par nous intéresser à cette fraction.

1. Protocole

La réaction d'oxydo-réduction catalysée par l'alcool déshydrogénase se fait de façon stéchiométrique avec le diphosphopyridine nucléotide et suivant le sens de la réaction, on lit l'absorption ou l'extinction à 340 m μ .

Réactifs :

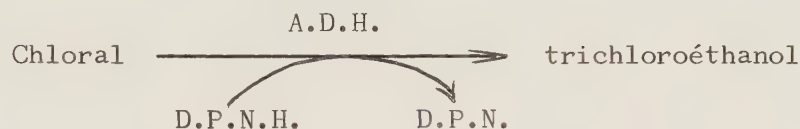
- Tampon glycine 0,1 M pH 9,58
- Solution D.P.N. 10 mg/ml d'eau
- Solution D.P.N.H. 3 mg/ml
- Chloral 1 mg/ml
- 75-25 C 1 mg/ml

Mélange de réaction :

- 2 ml surnageant S_{100}
- 1 ml tampon glycine
- 0,1 ml sol. D.P.N. ou D.P.N.H.
- 0,1 ml sol. substrat

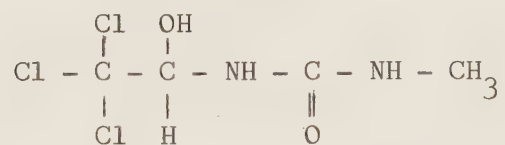
2. Résultats

La figure V montre que le chloral oxyde assez rapidement le D.P.N.H. suivant la réaction admise :



Comparativement, la figure VI montre que l'oxydation du D.P.N.H. en présence de 75-25 C, quoique visible, est beaucoup plus lente.

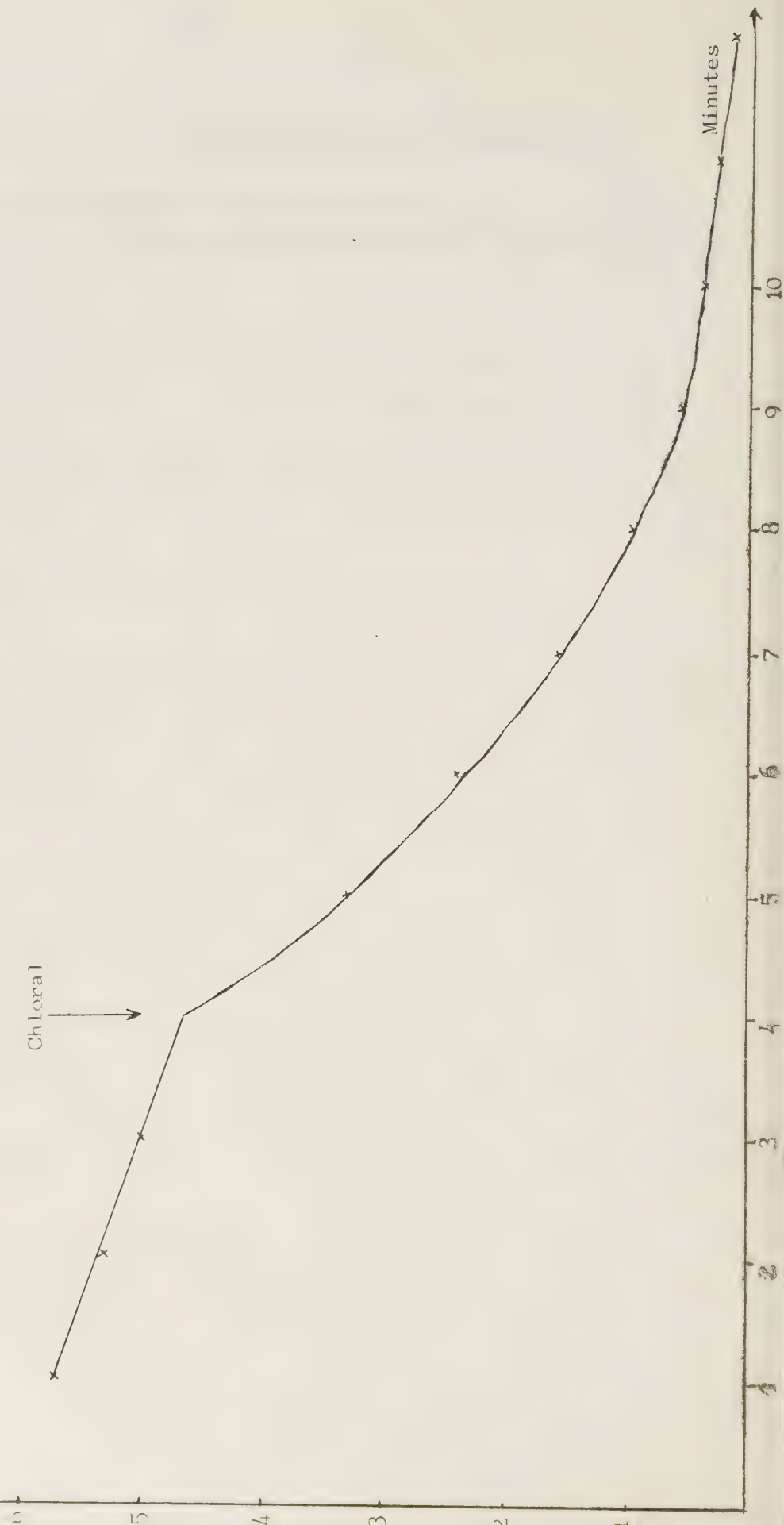
De par sa structure chimique, le 75-25 C



ne peut pas réagir directement par la réaction de l'A.D.H. avec le D.P.N.H.

{ D.P.N.H.
(Chloral)

Alcool déshydrogénase



↑ D.O. 340 mμ

Figure VI

Oxydation du D.P.N.H. en présence de 75-25 C

75-25 C



Minutes

E/ ACTION DU 75-25 C SUR LE METABOLISME DE L'ETHANOL

Egalement, de par sa structure, on peut se demander si le 75-25 C n'est pas métabolisé par l'A.D.H. dans le sens inverse, autrement dit sa fonction alcool ne peut-elle pas être oxydée en cétone. De même, la question était posée de savoir s'il interfère avec le métabolisme de l'éthanol.

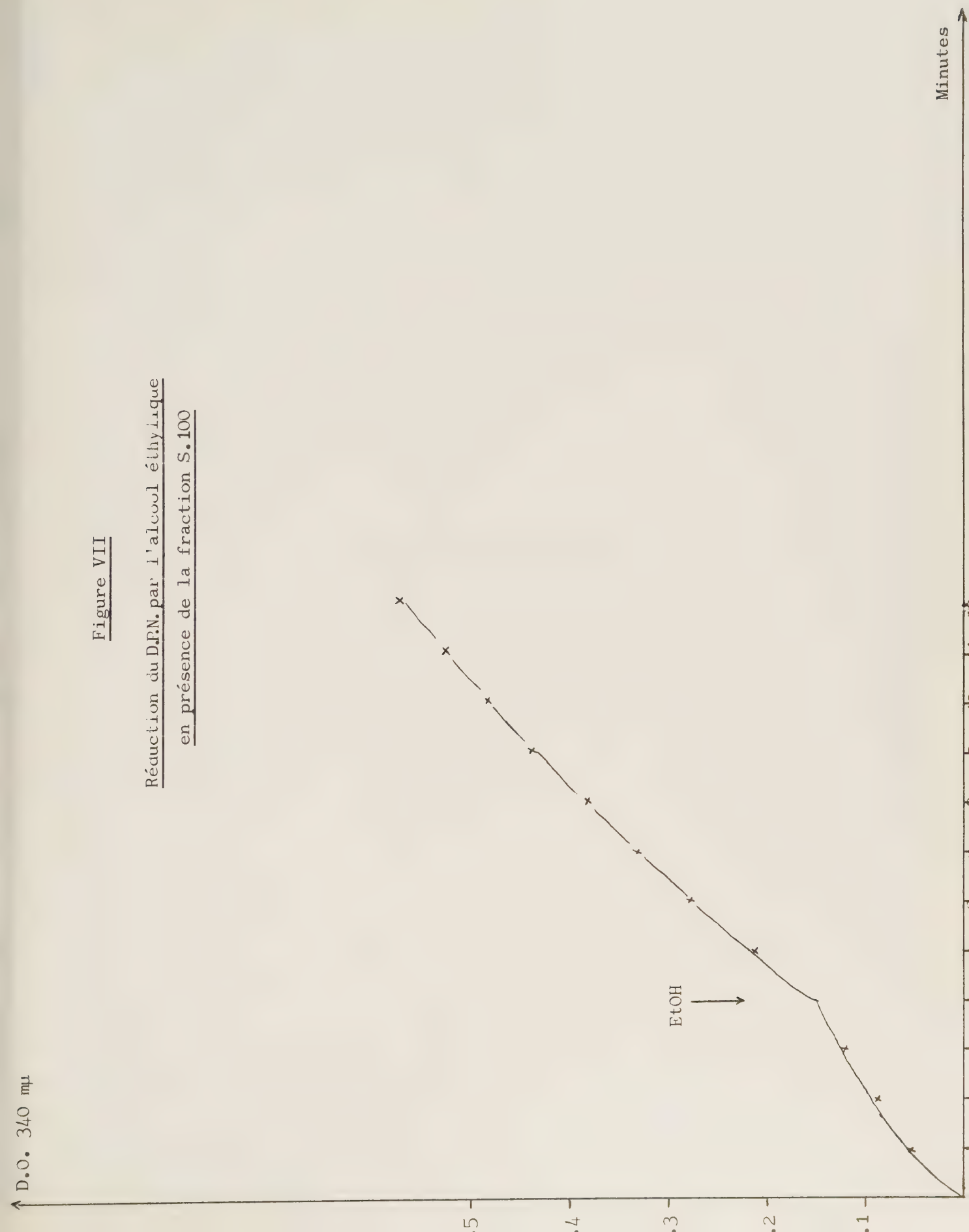
La figure VII montre l'expérience témoin de réduction du D.P.N. par l'alcool.

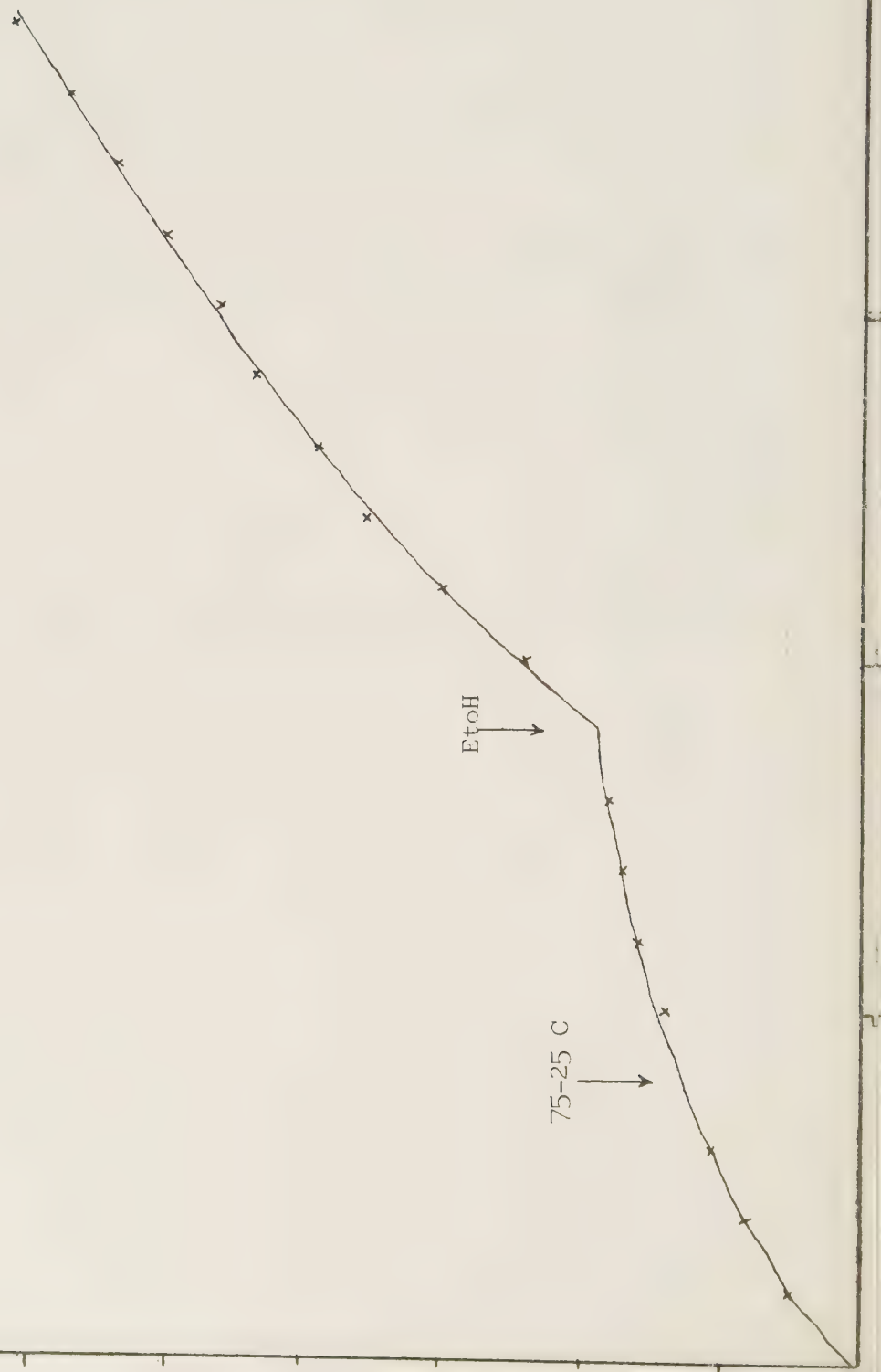
La figure VIII montre qu'apparemment le 75-25 C ne réduit pas le D.P.N. et ne modifie pas non plus l'oxydation de l'alcool de façon sensible.

Avant d'énoncer les conclusions de cette première partie, voyons quel est le métabolisme du 75-25 C in vivo.

Figure VII

Réduction du D.P.N. par l'alcool éthylique
en présence de la fraction S.100



Influence du 75-25 C sur la réduction du D.P.N.

ETUDE IN VIVO

A/ ETUDE DE L'ABSORPTION, LA DISTRIBUTION ET L'EXCRETION DU 75-25 C
APRES UNE ADMINISTRATION UNIQUE

1. Chez le rat

Administration orale d'une suspension de 75-25 C dans de l'eau gommée à 5 %.

a) Protocole

Les dosages ont été effectués selon la méthode décrite en annexe.

Sur des groupes de 3 animaux, nous avons prélevé le sérum, le foie et le cerveau aux temps suivants : 30', 1 h, 1 h 30, 2 h, 3 h, 5 h et 7 h après l'administration de 500 mg/kg.

L'élimination biliaire a été étudiée 1, 2, 3, 4 et 5 heures après administration de 100, 300 et 600 mg/kg P.O.

Enfin, les urines de 10 rats traités à 500 mg/kg P.O. ont été prélevées à 24 - 48 et 72 heures.

Les dosages ont été faits avant et après 48 h d'hydrolyse enzymatique (sauf pour le sérum).

b) Résultats

Les résultats obtenus, visualisés dans les figures suivantes, montrent que :

- 1 - la concentration sérique est maximale entre 1 et 2 h,
- 2 - la concentration cérébrale est maximale à 1 h et qu'il n'y a pas de produit conjugué,

3 - la concentration hépatique est maximale à 30', le produit étant à moitié conjugué - la conjugaison étant presque totale à 1 h,

4 - l'élimination biliaire de produits conjugués à 40 % est proportionnelle à la dose (10 % environ) en 5 h.

Enfin, l'élimination urinaire représente :

- 28 % de la dose administrée de 0 à 24 h,
- 1 % de la dose administrée de 24 à 48 h,
- 0,3 % de la dose administrée de 48 à 72 h,

les produits conjugués étant dans la proportion de 70 %.

Figure IX

Concentration dans le sérum

• Concentration moyenne

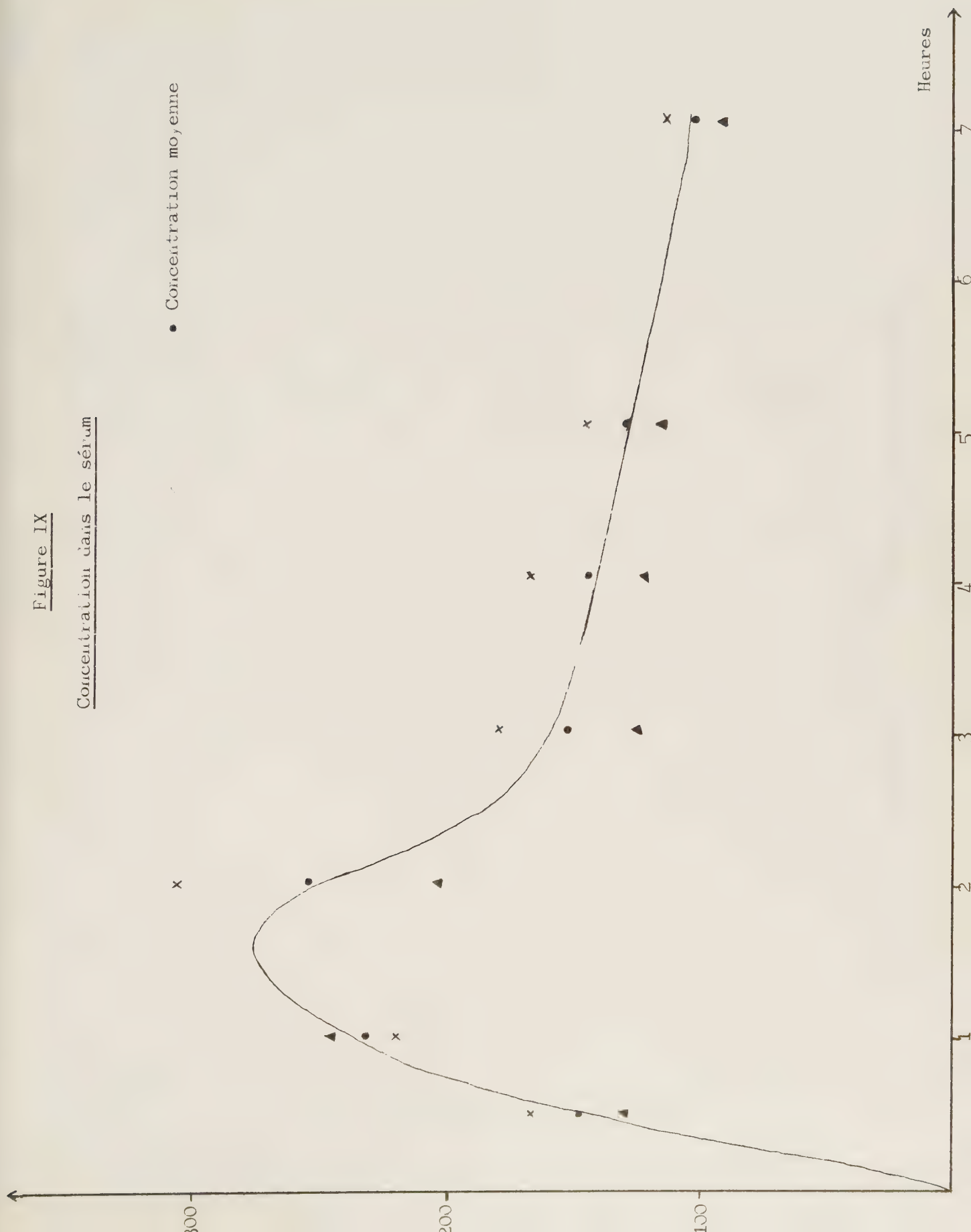


Figure X

Concentration dans le cerveau en fonction du temps

x — x Concentration totale
Δ — Δ Concentration non estérifiée

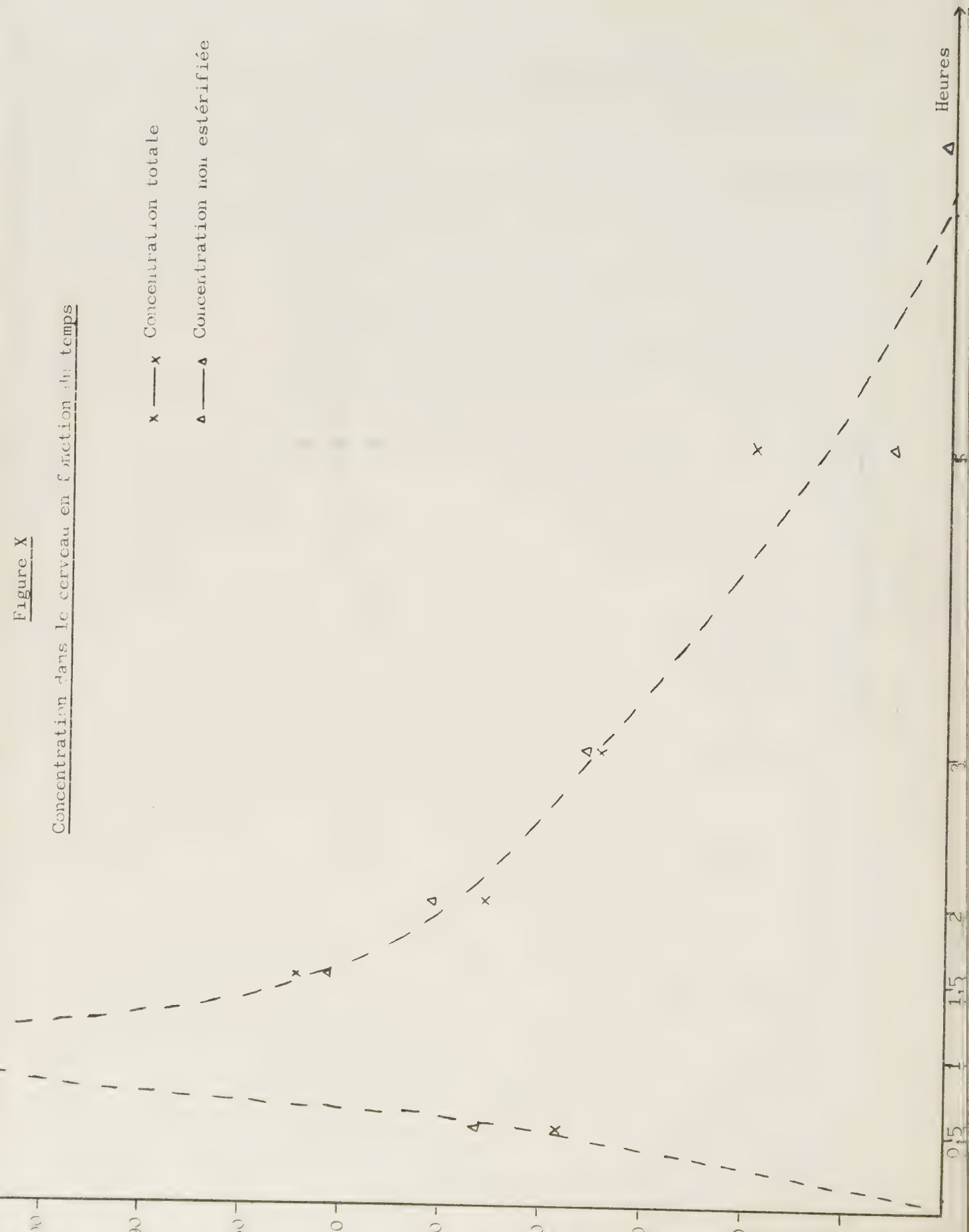


Figure XI

Concentration dans le foie en fonction du temps

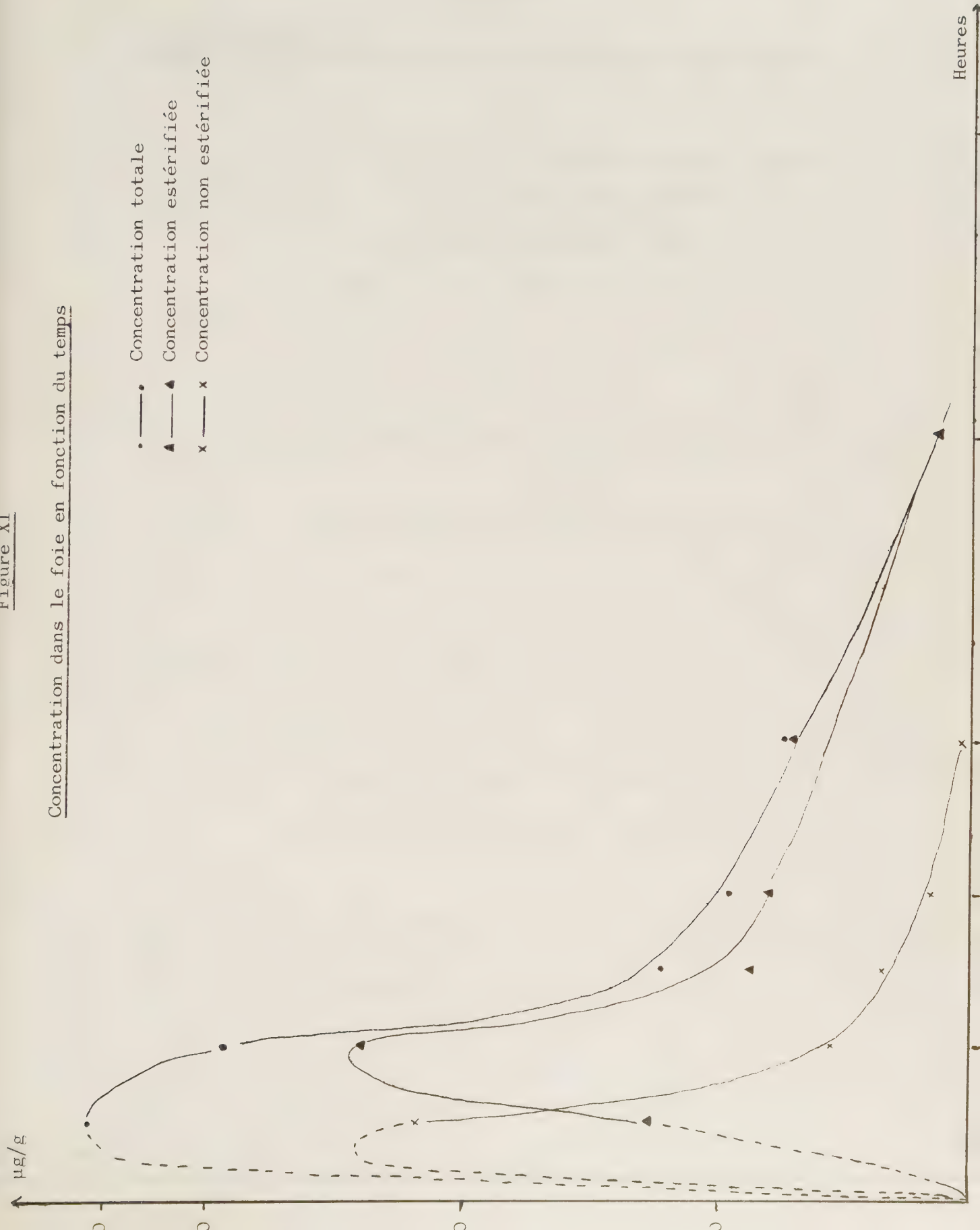
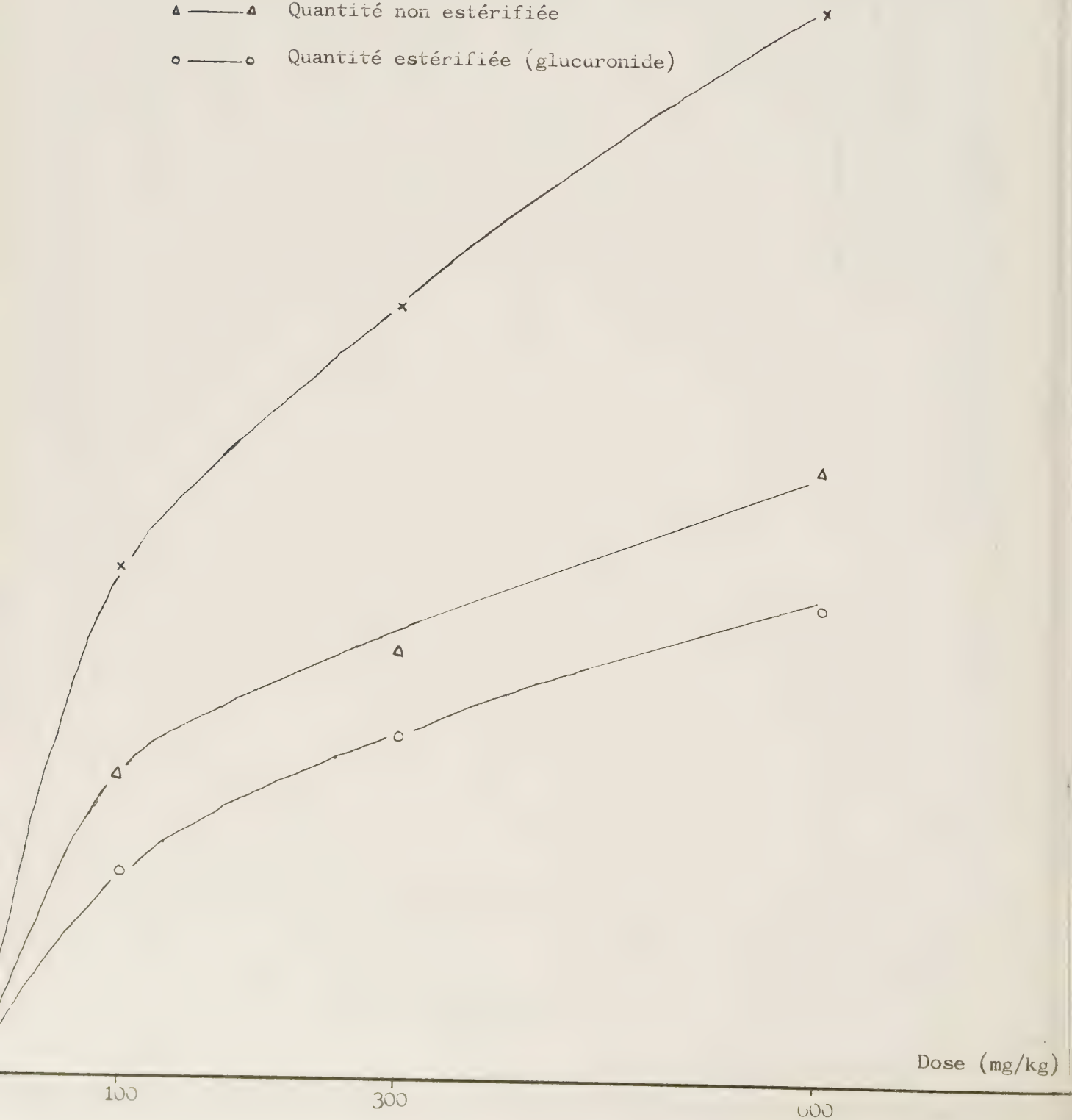


Figure XII

Quantité sécrétée dans la bile, en 5 h, en fonction de la dose

- x — x Quantité totale
Δ — Δ Quantité non estérifiée
o — o Quantité estérifiée (glucuronide)



2. Chez l'homme

a) Protocole

12 sujets mâles en bonne santé apparente ont reçu le matin 200 mg de 75-25 C et leur sang a été prélevé 1/2 h, 1 h, 3 h et 5 h après et leurs urines recueillies pendant 24 h.

Les dosages ont été faits avant et après hydrolyse enzymatique.

b) Résultats

- Les concentrations sériques en produits trichlorés sont faibles, de l'ordre de 3 à 4 γ en moyenne,
- elles sont presque identiques aux 4 temps examinés,
- il ne semble pas y avoir de glycuconjugués,
- l'élimination urinaire est d'environ 20 % du produit administré dont 70 % sous forme conjuguée.

c) Discussion

La faible concentration sérique s'explique :

- par la petitesse de la dose administrée par rapport à l'animal,
- par les volumes apparents de distribution : si l'absorption du produit est complète, les 200 mg se répartissent, pour un sujet de 60 kg, dans les 2/3 de son poids, soit 40 kg, ce qui fait au maximum 5 γ /ml.

B/ COMPARAISON DU COMPORTEMENT ET DES TAUX CEREBRAUX DE PRODUITS TRICHOLORES APRES ADMINISTRATION UNIQUE DE 75-25 C ET D'UNE DOSE EQUIMOLECULAIRE DE CHLORAL

1. Chez le rat

a) Protocole

Administration à 4 lots de 12 rats de :

- 500 et 700 mg/kg P.O. de 75-25 C,
- 372 et 523 mg/kg P.O. de chloral.

Prélèvement des cerveaux de 2 rats par lot 30', 1 h, 1 h 30, 2 h, 2 h 30 et 5 h après.

Dosage sur le broyat des 2 cerveaux selon la méthode habituelle.

b) Résultats

Comportement

Aucun des rats ayant reçu le 75-25 C n'a dormi, ils étaient calmes.

Avec le chloral : à 372 mg/kg, 4 sur 12 ont dormi,
à 523 mg/kg $\left\{ \begin{array}{l} 7 \text{ sur 12 ont dormi} \\ 5 \text{ sur 12 étaient assoupis.} \end{array} \right.$

Dosages

Visualisés sur les courbes ci-jointes qui montrent :

- une concentration cérébrale maximum entre 1 h et 1 h 30 pour le 75-25 C et entre 30' et 1 h pour le chloral,
- un taux cérébral équivalent pour les 2 produits, du moins à la faible dose (alors que seuls des animaux ayant reçu du chloral dormaient),

- une absence de proportionnalité entre le maximum et la dose administrée qui semble retentir plutôt sur la vitesse d'élimination,
- une différence absolue de coloration avant l'addition de benzidine :
 - . coloration jaune pour les animaux au chloral indiquant sa transformation préalable en trichloroéthanol,
 - . coloration rose pour le 75-25 C indiquant sa présence dans le cerveau en tant que tel et non métabolisé.

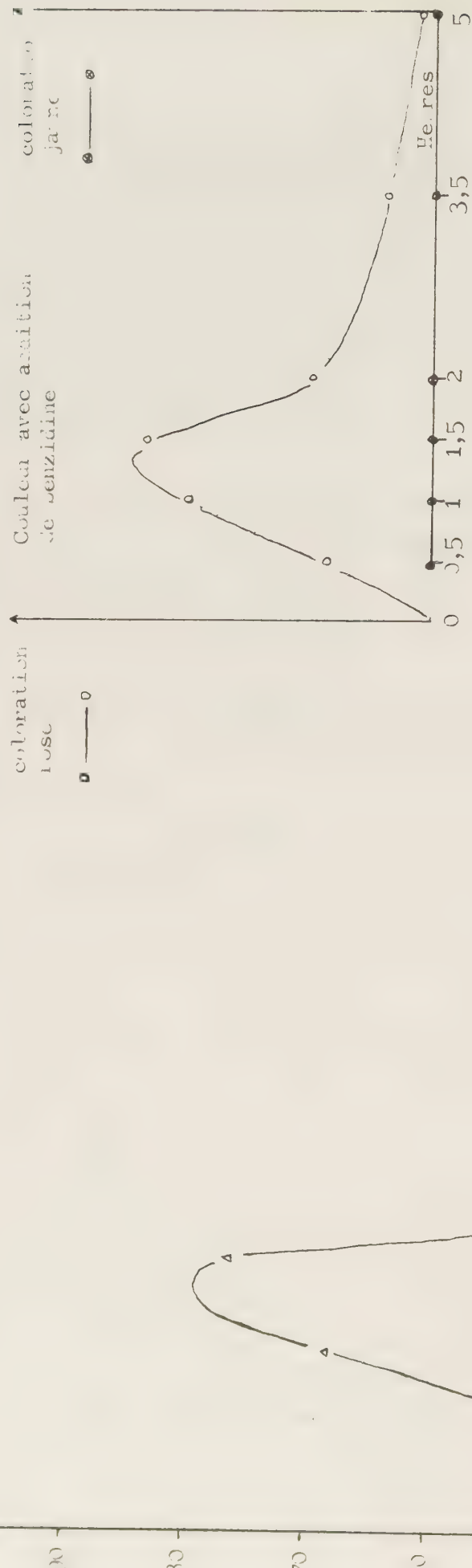
Nous avons vu, en effet, lors des essais in vitro, que les broyats de cerveau ne transformaient pas le 75-25 C, ni le chloral, contrairement aux broyats de foie ou de rein qui transforment ces deux produits en trichloroéthanol.

Donc, si le 75-25 C était métabolisé avant de pénétrer dans le cerveau, on devrait trouver une coloration jaune.

Figure XIII

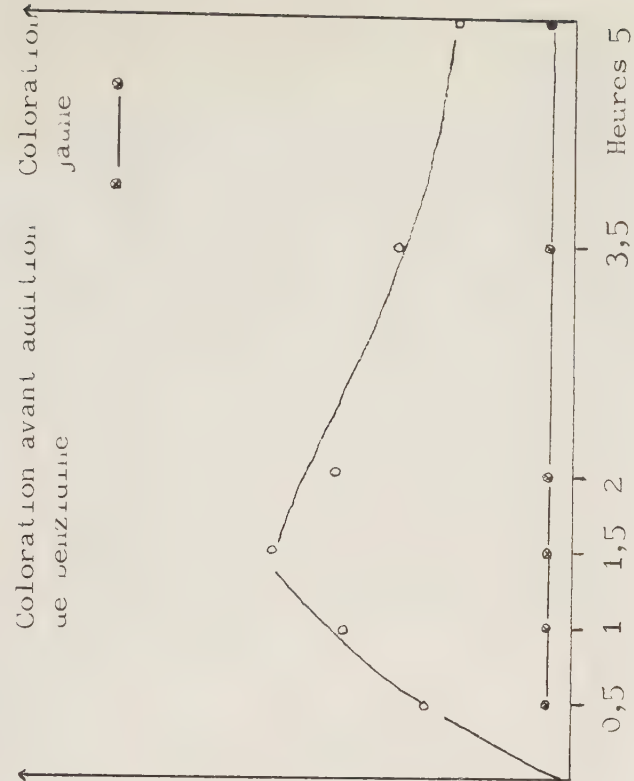
75-25 C (500 mg/kg P.O.)

Concentration dans le cerveau (rat) en fonction du temps



75-25 C (700 mg/kg P.O.)

Concentration dans le cerveau (rat) en fonction du temps

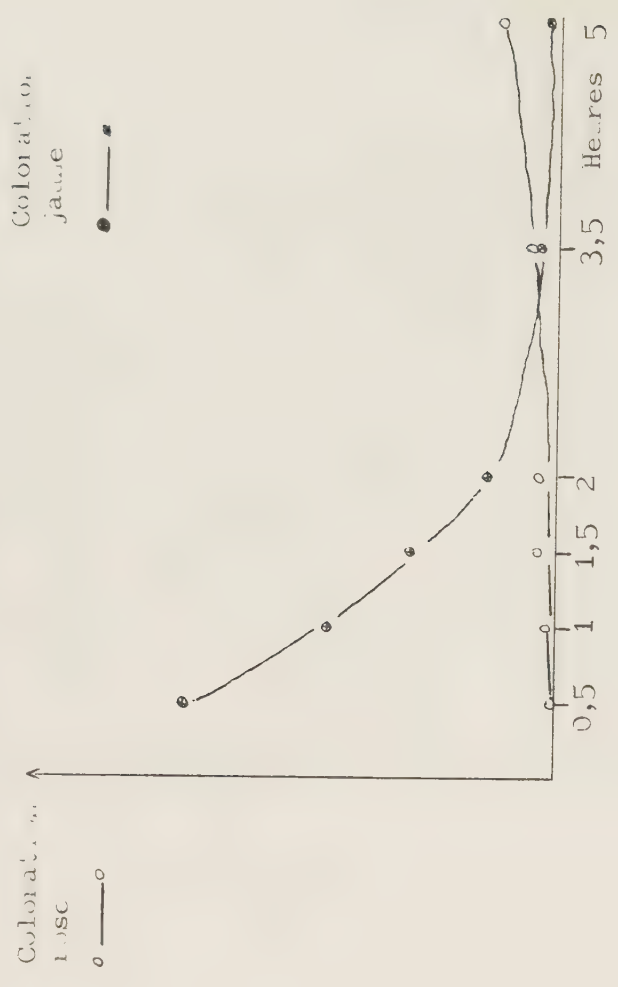


ml

Figure XV

Chloral (hydrate, 372 mg/kg P.O.)

Concentration dans le cerveau (rat) en fonction du temps



Heures



Figure XVI

Cinoral (hydrate, 523 mg/kg P.O.)

Concentration dans le cerveau (rat) en

Coloration
rose
○ — ○

fonction du temps

Coloration avant addition
de benzidine

Coloration
jaune
● — ●

Heures 5

3,5

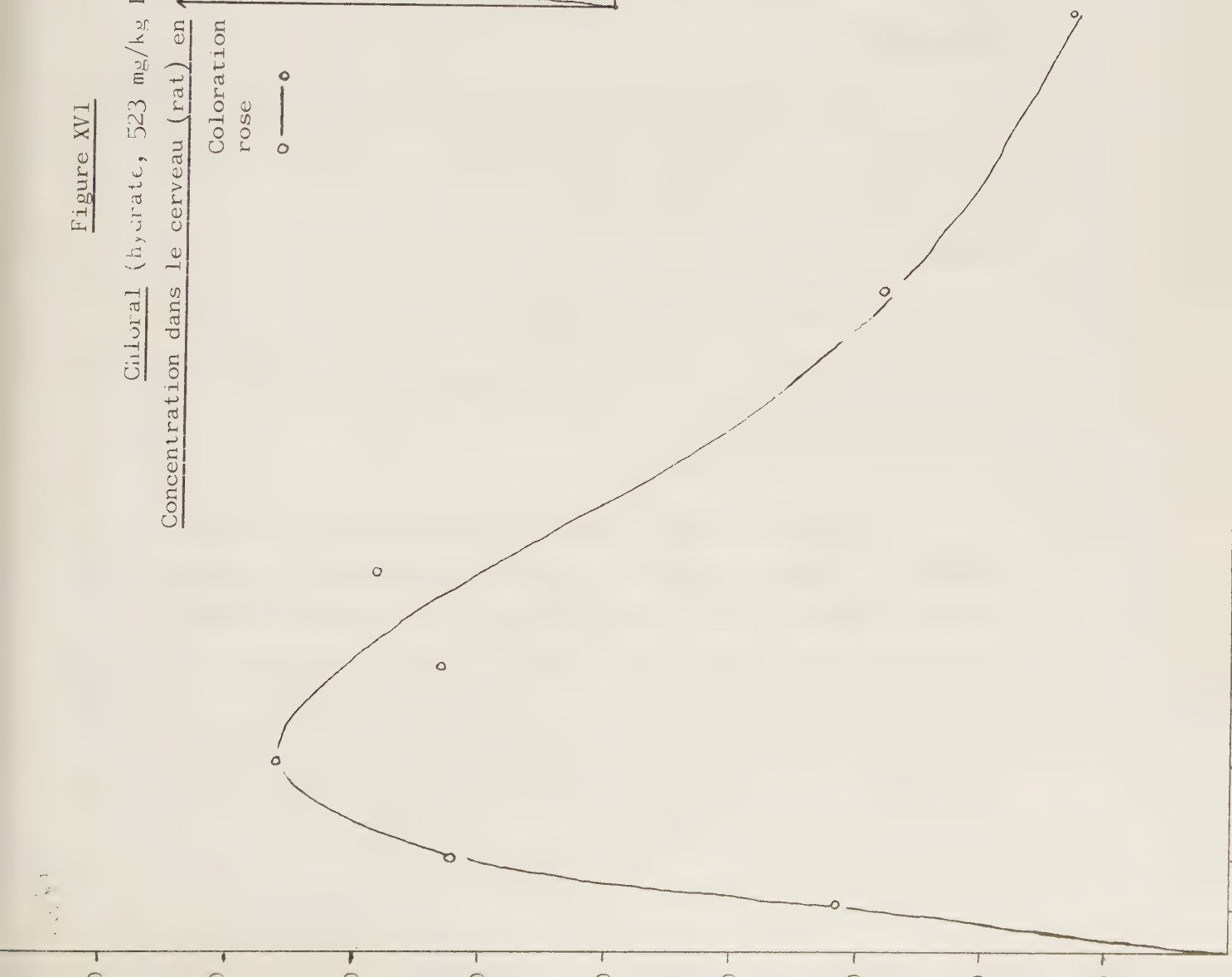
2

1,5

1

0,5

0,25



2. Chez la souris

a) Protocole

Administration à 2 lots de 28 souris de :

- 500 mg/kg P.O. de 75-25 C,
- 372 mg/kg P.O. de chloral.

Prélèvement des cerveaux de 4 souris par lot 15', 30', 1 h, 1 h 30, 2 h, 3 h 30 et 5 h après.

b) Résultats

Comportement

Les souris traitées par le 75-25 C étaient très calmes mais ne dormaient pas ; alors que toutes les souris traitées au chloral ont dormi pendant les 2 premières heures.

Dosages

Visualisés sur les courbes ci-jointes.

(Les lettres portées sur les graphiques aux différents temps signifient : S = sommeil

C = calme

N = normale).

On peut remarquer sur ces graphiques que la concentration cérébrale en produits trichlorés est plus forte pour le 75-25 C que pour le chloral pendant les 2 premières heures alors que précisément les souris ne dormaient pas avec le 75-25 C et dormaient avec le chloral. On peut donc en déduire qu'il ne s'agit pas du même métabolite, bien que la coloration avant adjonction de benzidine soit la même dans les 2 cas (nous avons vu, lors des expérimentations in vitro que 75-25 C et chloral donnaient la même coloration rose avant benzidine).

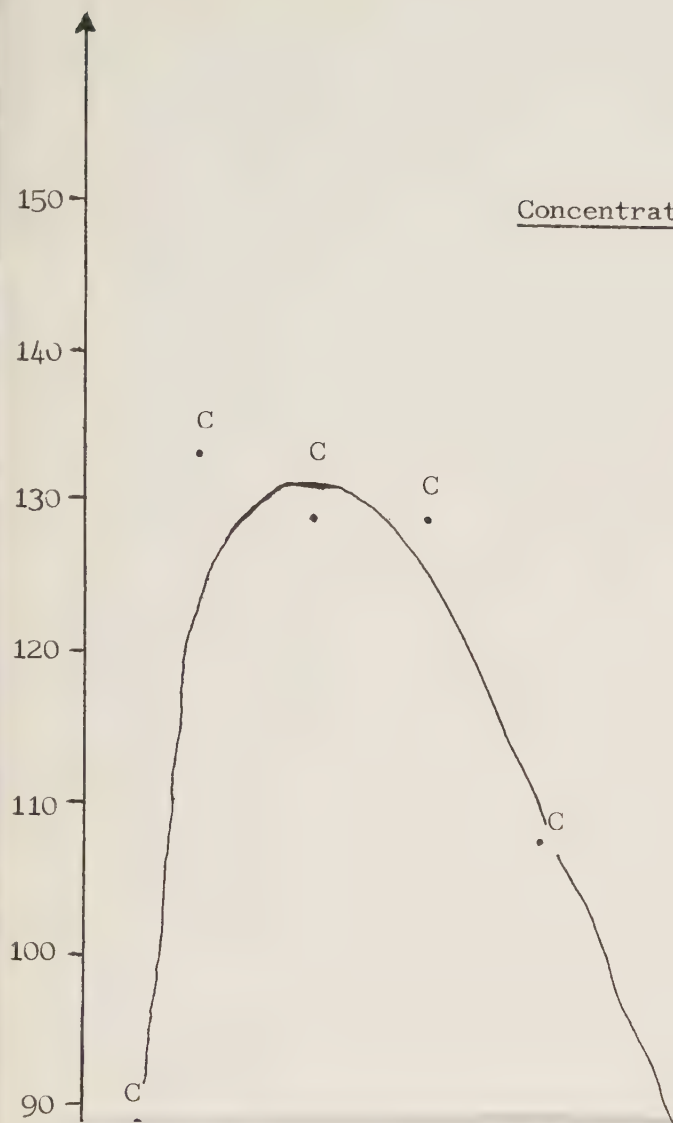
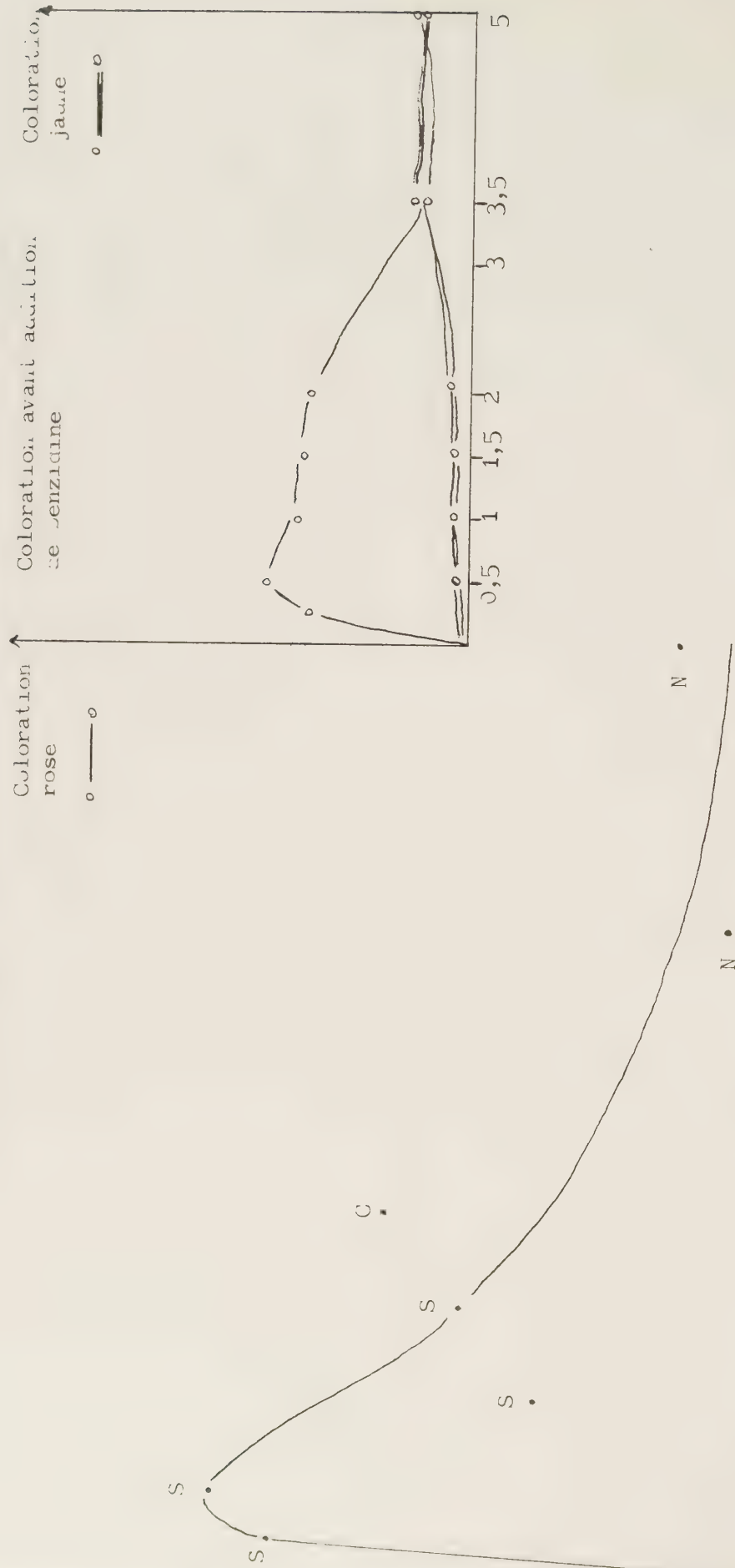
Concentration dans

Figure XVIII

Cutoral (372 mg/kg P.O.)

Concentration dans le cervical (souris) en fonction du temps



C/ ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES PRODUITS TRICHOLORES APRES ADMINISTRATION
REPETEE

1. Chez la souris

a) Protocole

2 lots de 24 souris de même lignée ont reçu tous les jours pendant au maximum 12 jours (sauf le 7ème) :

- lot I : 500 mg/kg P.O. de 75-25 C,
- lot II : 372 mg/kg P.O. de chloral.

Les 3ème, 5ème, 8ème et 11ème jours, nous avons sacrifié 4 souris et recueilli : sang, foie, rein et cerveau pour le dosage des produits trichlorés.

Après 4 jours d'arrêt du traitement, nous avons sacrifié les 8 souris restantes et fait sur elles les mêmes prélèvements.

Les sacrifices ont été pratiqués toujours à la même heure, 1 heure après l'administration du produit.

b) Résultats

- Dans le cerveau : les taux de produits trichlorés sont supérieurs après 75-25 C et sont compris entre 130 et 180 γ ; ils oscillent entre 70 et 110 γ pour le chloral. Il n'y a pas d'accumulation et 4 jours après arrêt du traitement, le dosage est nul.

- Dans le sérum : résultats identiques.
Taux compris entre 220 et 360 γ /ml pour le 75-25 C.
Taux compris entre 100 et 240 γ /ml pour le chloral tant que dure l'administration.
- Dans le foie : taux compris entre 320 et 540 γ /ml pour le 75-25 C.
Taux compris entre 100 et 250 γ /ml pour le chloral.
- Dans le rein : taux très variables avec le 75-25 C mais toujours supérieurs à ceux du chloral - Pas d'accumulation.

Tous les dosages pratiqués après 4 jours d'arrêt ont été négatifs.

2. Chez le lapin

a) Protocole

4 lapins ont reçu 10 mg/kg de 75-25 C par tubage gastrique 6 jours par semaine pendant 4 semaines.

Leur sang était prélevé par ponction cardiaque 2 fois par semaine, 6 heures après l'administration du produit.

Pendant ces 6 heures, leurs urines étaient recueillies par sondage.

Au bout de 4 semaines, le traitement a été interrompu et les animaux ont été sacrifiés au bout de 48 h et on a prélevé foie, rein, cerveau et sang pour rechercher une éventuelle accumulation de dérivés trichlorés.

b) Résultats

Dans le sérum, les taux ont varié entre 6 et 10 γ /ml chez les 4 lapins.

Dans les urines, l'élimination assez faible au départ (< 10 % de la quantité administrée) est devenue plus importante à partir du 9ème jour et est restée à des taux de 15 à 30 % de la quantité administrée jusqu'à la fin de l'expérimentation avec un taux de conjugaison élevé (80 %).

48 h après l'arrêt du traitement, la recherche de produits trichlorés a montré :

- leur absence dans le cerveau et les reins,
- leur persistance dans le sérum et le foie mais à des taux faibles : 3,8 γ /ml de sérum,
13 γ /g de foie.

3. Chez l'homme

a) Protocole

La recherche d'une accumulation de dérivés trichlorés a été faite :

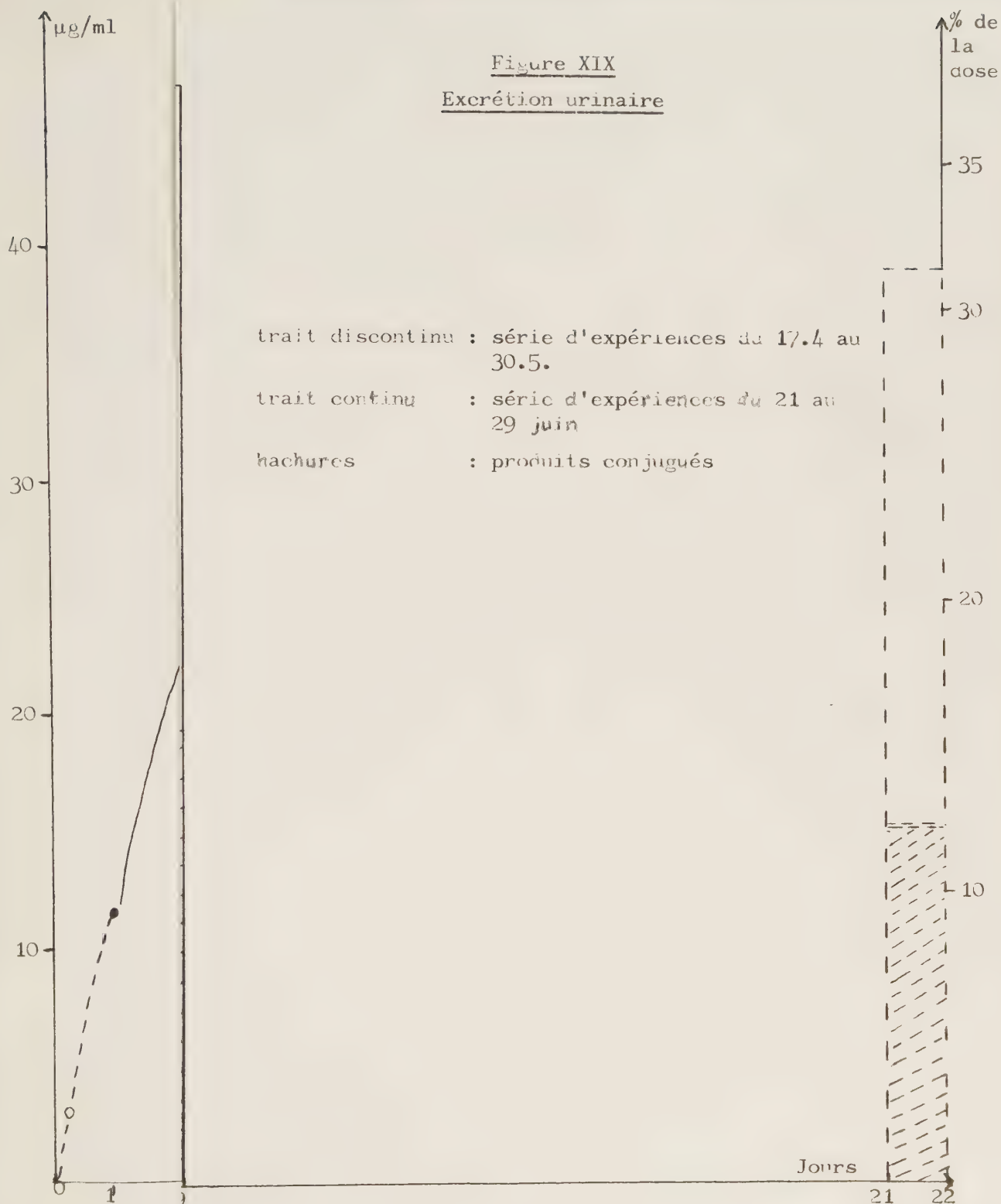
- sur 3 sujets mâles après 1, 5 et 8 jours de prise quotidienne de 75-25 C (100 mg, 3 fois par jour). La ponction de sang était faite le matin, à jeun, 1 heure après la prise du 1er comprimé. D'autre part, on recueillait les urines sur 24 h,

- sur 12 sujets mâles, au 21ème jour après une posologie identique (ces mêmes sujets avaient fait l'objet de dosages répétés après une administration unique de 200 mg).

b) Résultats

Le graphique ci-joint montre que le taux sanguin de produits trichlorés atteint son maximum en une semaine environ, aux alentours de 40-50 γ /ml. Parallèlement, l'élimination urinaire augmente au 5ème jour pour se maintenir aux environs de 30 à 40 % de la dose administrée. Les taux de conjugaison oscillent entre 40 et 60 % de produits éliminés.

Figure XIX
Excrétion urinaire



A N N E X E S

A/ METHODE DE FUJIWARA MODIFIEE

1. Principe du dosage

Le dosage est basé sur la réaction de FUJIWARA : les composés polyhalogénés, en présence d'alcali fort, forment avec la pyridine, à chaud, des produits ayant une coloration rouge.

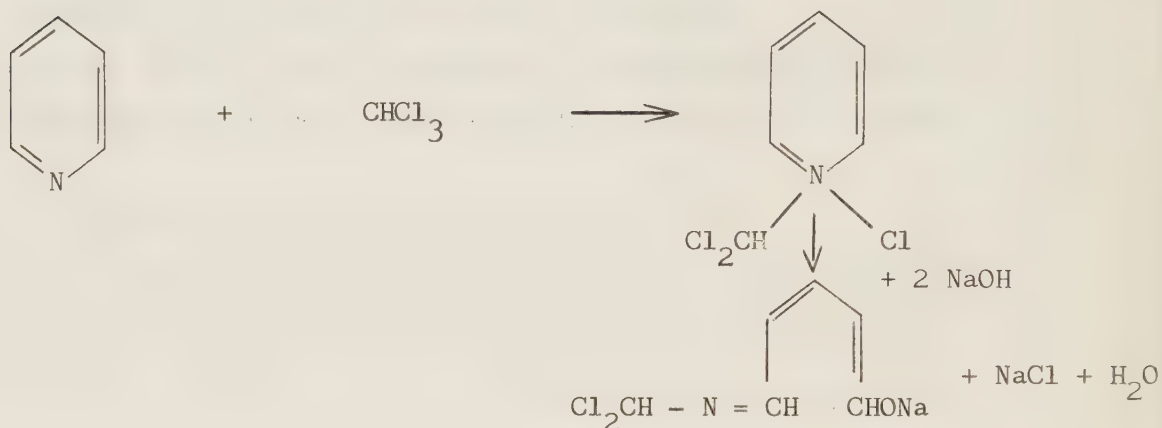
Nous avons adopté, tout d'abord, la méthode de FRIEDMAN et COOPER (19) qui consiste essentiellement à mesurer l'absorption des produits colorés non pas à 540 m μ comme on le fait généralement, mais à 370 m μ . L'absorption à 370 m μ est beaucoup plus forte qu'à 540 m μ et surtout plus reproductible et un peu plus stable.

Or, cette méthode est très bonne si on n'a qu'un faible nombre d'échantillons à analyser, parce que la procédure demande la séparation de la souche pyridinique (qui le plus souvent est trouble), l'addition d'une quantité d'eau et très souvent la filtration sur un filtre préalablement mouillé par une quantité mesurée d'eau (0,5 ml). Elle comporte des erreurs inhérentes à cette filtration car de façon apparente on voit une partie de la coloration retenue par le filtre.

Dans le but d'améliorer le processus d'analyse, nous avons réétudié la réaction de FUJIWARA.

D'après FEIGL (17), on peut penser que les produits colorés sont des bases de Schiff de l'aldéhyde glutaconique. Elles sont formées

par ouverture du cycle de la pyridine après addition des composés polyhalogénés. Par exemple, dans le cas du chloroforme, on pourrait écrire :



Dans le test qualitatif décrit par FEIGL, l'auteur recommande d'ajouter, en fin de réaction, de l'acide acétique et une amine aromatique telle que la benzidine pour obtenir une coloration ou un précipité rouge violacé. Nous avons pensé que ces produits pourraient résoudre notre problème.

Des essais qualitatifs ont montré que la coloration obtenue est :

- . beaucoup plus intense,
- . beaucoup plus stable.

L'addition d'une quantité suffisante de réactif supprime les 2 phases en donnant une solution limpide, ce qui simplifie énormément l'opération.

L'absorption montre un maximum homogène à $510 \text{ m}\mu$.

2. Mode opératoire

- 1 ml solution à analyser
- 5 ml pyridine
- 1 ml KOH 10 N
- Chauffage au bain-marie bouillant 4 mn
- Refroidir dans un bain d'eau glacée
- Additionner :

5 ml d'une solution d'acétate de benzidine à 1 %,
benzidine 1 g
acide acétique glacial 100 ml

Laisser reposer 30 minutes et lire à 510 mμ.

B/ PREPARATION DES ECHANTILLONS

1. Préparation des échantillons d'organes (cerveau - foie - reins)

3 g d'organe sont broyés au Potter-Elvehjem avec
4,5 ml de sérum physiologique et précipiter par
2,25 ml d'acide sulfosalicylique à 40 %.

On laisse reposer 20 minutes et on centrifuge. Le surnageant (1 ml) sert au dosage.

2. Préparation des échantillons de sérum

Après coagulation, le sérum recueilli est centrifugé.

Le surnageant est pipeté	1 ml
dilué avec du sérum physiologique	2 ml
et précipité à l'acide sulfosalicylique .	2 ml

On pipette 1 ml de surnageant pour effectuer le dosage.

3. Préparation des échantillons d'urine

a) Sans hydrolyse enzymatique

10 ml d'urine sont additionnés de
10 ml d'acide sulfosalicylique,
1 ml de ce mélange est prélevé pour le dosage.

b) Hydrolyse à l'aide de la β -glucuronidase

10 ml d'urine sont additionnés de
10 ml tampon phosphate pH 5,94
1 goutte de toluène,
30 μ l β -glucuronidase (à 100 000 unités/ml)
et laissés à la température ordinaire pendant 48 h
1 ml de ce mélange sert au dosage.

4. Préparation des échantillons de bile

Dilution au 1/20 avec du ClNa à 9‰ pour le dosage direct.

2ème dilution au 1/2 avec du tampon phosphate (pH 5,94).

C/ ULTRA-CENTRIFUGATION

On prélève immédiatement le foie après sacrifice de l'animal et on maintient, jusqu'au moment de l'incubation, une température de 0 à 4°.

Le foie est homogénéisé dans Potter-Elvehjem à piston en téflon avec 7 fois son volume de tampon phosphate à pH 7.

L'homogénat est centrifugé à 10 000 tpm pendant 15 minutes pour éliminer les tissus, cellules, débris cellulaires, noyaux et mitochondries.

Le surnageant est centrifugé de nouveau à 20 000 tours, 30 minutes, pour éliminer les mitochondries restantes, les lysosomes et particules moins denses.

Le nouveau surnageant est centrifugé une troisième fois à 30 000 tpm pendant une heure : le culot est constitué en bonne partie de microsomes et le surnageant que nous dénommons S_{100} (correspondant à 100 000 g).

CONCLUSIONS

L'étude du métabolisme de la MECLORALUREE - 75-25 C - qui vient d'être présentée permet de mettre en évidence les faits suivants :

I - Concernant l'expérimentation in vitro :

- 1 - Le 75-25 C n'est pas détruit en milieu entérique et traverse donc tel quel la muqueuse digestive.
- 2 - Le 75-25 C se transforme en trichloroéthanol en présence d'homogénat de foie (en particulier surnageant S₁₀₀) ou de rein, Par contre, le cerveau est inactif.
- 3.- Le 75-25 C est déshalogéné rapidement et dans des proportions importantes en présence de broyats de foie, (et surnageant S₁₀₀) cerveau, rein et aussi en présence de sérum humain.
- 4 - Nous n'avons pu mettre en évidence in vitro la transformation du 75-25 C en glycuronide ou en acide trichloroacétique.
- 5 - La liaison aux protéines est 3 fois plus importante pour l'acide trichloroacétique que pour le 75-25 C.
- 6 - Le 75-25 C est dégradé par l'alcoolodéshydrogénase, mais moins rapidement que le chloral.
- 7 - Le 75-25 C n'inhibe pas l'oxydation de l'alcool par l'alcoolodéshydrogénase.

II - Concernant l'expérimentation in vivo :

- 1 - Chez le rat et la souris, le 75-25 C semble bien exister dans le cerveau en tant que tel ou, du moins, non transformé en chloral ou en trichloroéthanol.

- 2 - Contrairement au rat, la souris ne transforme pas le chloral en trichloroéthanol avant son passage dans le cerveau.
- 3 - Chez la souris, il faut que le 75-25 C soit à une concentration supérieure à 60 γ par gramme de cerveau (à cette dose le chloral est hypnogène alors que, même à concentration double, le 75-25 C ne l'est pas).
- 4 - Chez l'homme une partie du 75-25 C se métabolise en acide trichloro-acétique qui disparaît plus difficilement de la circulation car :
 - il ne se déchlorure pas dans l'organisme humain,
 - il ne se conjugue pas,
 - et surtout, il est fortement lié aux protéines.

Nous constatons ainsi que le métabolisme d'une substance donnée présente un intérêt indiscutable dans les domaines pharmacologique, toxicologique et clinique. Cependant de nombreux problèmes sont apparus au cours de cette étude :

- 1 - Difficultés d'interprétation des résultats expérimentaux du fait des activités pharmacologiques respectives du médicament et de ses métabolites et de la cinétique des processus de distribution et de transformation de ceux-ci.
- 2 - Manque de parallélisme entre les essais in vitro et in vivo.
- 3 - Mais surtout obstacle majeur concernant la transposition des résultats de l'animal à l'homme, et même variantes d'un homme à un autre homme.

Le choix de l'espèce animale est donc un problème important pour l'expérimentateur. L'espèce idéale serait celle qui métaboliserait les médicaments comme le fait l'homme. Malheureusement cette espèce reste à découvrir ! (10)

Toutefois, l'étude du métabolisme de la MECLORALUREE nous laisse entrevoir la perspective heureuse de pouvoir fournir au médecin praticien un nouveau moyen d'action sur un des maux de notre siècle : L'ANXIETE.

B I B L I O G R A P H I E

1. ALEXANDER F. - The salivary secretion and clearance in the horse of chloral hydrate and its metabolites.
Biochem. Pharmacol., 1967, 16, 1305-1311.
2. BOISSIER J.R. - Expertise pharmacologique des substances psychotropes.
Encéphale, 1961, 50, 340-359.
3. BOISSIER J.R., SIMON P. - Psychopharmacologie expérimentale et effets secondaires des médicaments.
Bull. Inst. Nat. Santé, 1966, 21, 813-827.
4. BOISSIER J.R. - Préface.
In : HIRTZ J. - "Les méthodes analytiques dans les recherches sur le métabolisme des médicaments".
Paris, Masson, 1968, pp VII - X.
5. BRAY H.G., THORPE W.V., VALLANCE D.K. - The liberation of chloride ions from organic chloro compounds by tissue extracts.
Biochem. J., 1952, 51, 193-201.
6. BRODIE B.B. - Kinetics of absorption, distribution, excretion and metabolism of drugs.
In : NODINE J.H., SIEGLER P.E. - éd.
"Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation".
Chicago, Year Book Medical publishers, 1964, T 1, pp 69-88.
7. BUCHER L. - Le trichloréthanol, principal métabolite de l'hydrate de chloral, est-il le seul responsable des effets hypnotiques manifestés par celui-ci ?
Thérapie, 1965, 20, 246-248.
8. BUCHER L., LEVY J. - Durée de la présence de l'hydrate de chloral et de ses métabolites dans le cerveau de rat. Conséquences.
J. Physiol., 1963, 55, 212-213.
9. CABANA B.E., GESSNER P.K. - Determination of chloral hydrate, trichloroethanol, trichloroacetic acid, and urochloralic acid in the presence of each and in tissue homogenates.
Anal. Chem., 1967, 39, 1449-1452.
10. Chambre syndicale des fabricants de produits pharmaceutiques - Des essais biologiques à l'étude clinique des médicaments.
Paris, les Impressions techniques, 1967, 71 p.
11. DAVIS J.M. - Efficacy of tranquilizing and antidepressant drugs.
Arch. Gen. Psychiat., 1965, 13, 552-572.
12. DELAY J. - Psychopharmacologie en psychiatrie.
Cah. Anesth., 1967, 15, 541-567.

13. DENIKER P. - Apport de la clinique à la recherche psychopharmacologique.
Rev. Méd., 1967, 8, 535-545.
14. DIRHEIMER G. - Transformations métaboliques des médicaments.
Chim. Thérap., 1966, 1, (7), 467-477.
15. DONADIEU Y., ALBRECHT E. - Thérapeutique psychotrope. (Classification et nomenclature des médications chimiothérapeutiques).
Paris, Maloine, 2ème édition, 1966, 238 p.
16. ECOBICHON D.J., SASCHENBRECKER P.W. - Dechlorination of DDT in frozen blood.
Science, 1967, 156, 663-665.
17. FIEGL F. - Spot tests in organic analyses.
Amsterdam, Elsevier, 1960, 6ème Ed., 327 p.
18. FIESER L.F., FIESER M. - Advanced organic chemistry.
New York, Reinhold, 5ème Ed., 1965, p. 157.
19. FRIEDMAN P.J., COOPER J.R. - Determination of chloral hydrate, trichloroacetic acid, and trichloroethanol.
Anal. Chem., 1958, 30, 1674-1676.
20. FRIEDMAN P.J., COOPER J.R. - The role of alcohol dehydrogenase in the metabolism of chloral hydrate.
J. Pharm. Exp. Ther., 1960, 129, 373-376.
21. GESSNER P.K., CABANA B.E. - Chloral alcoholate : reevaluation of its role in the interaction between the hypnotic effects of chloral hydrate and ethanol.
J. Pharm. Exp. Ther., 1967, 156, 602-605.
22. GINESTET D. - Différences entre neuroleptiques, tranquillisants et hypno-sédatifs dans leurs applications et leur efficacité pour le traitement des désordres psychiatriques.
In : BRILL H. et al. éd. - "Neuro-Psycho-Pharmacology".
(Proceedings of the fifth international congress of the collegium internationale neuro-psycho-pharmacologicum. 1966, Washington).
Amsterdam, Excerpta Medica Foundation, 1967, pp. 138-145.
23. HIRTZ J. - Les méthodes analytiques dans les recherches sur le métabolisme des médicaments.
Paris, Masson, 1968.
24. JOHNSON M.K. - Metabolisme of chlorethanol in the rat.
Biochem. Pharm., 1967, 16, 186-199.
25. LOVCHIKOV V.A. - (Effect of chloral hydrate sleep on the conditioned reflex activity of dogs). - En russe
Résumé en anglais.
Fiziol. Zh. (Kiev), 1963, 9, 458-464.
26. LOWRY O.H. et al. - Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275.

27. MASCHERPA P. - Organotropisme et action sélective des médicaments neuropsychotropes.
Méd. Hyg., 1967, 25, 417-422.
28. MATHIEU-LEVY N. - Métabolisme de quelques hypnotiques (hydrate de chloral, trichloréthanol, métubarbital, thiopental) chez le rat, au cours du sommeil expérimental potentialisé par l'acide adénosine triphosphorique.
Thérapie, 1967, 22, 945-956.
29. MENDE T.J., VIAMONTE L. - Studies on chloral hydrate and camphor sensitivity in rats of different ages.
Gerontologia, 1967, 13, 165-172.
30. NODINE J.H., SIEGLER P.E. ed - Animal and clinical pharmacologic techniques in drug evaluation.
Chicago, Year Book Medical publishers, 1964, I I.
31. PETERS L. - Urinary excretion of drugs.
In : BRODIE B.B., ERDOS E.G. - Vol 6 : "Metabolic factors controlling duration of drug action".
(Proceedings of the first International Pharmacological Meeting - Mode of action of drugs).
Oxford, Pergamon Press, 1962, pp. 179-191.
32. ROSENBLUM C., TAVERNA C., WENDLER N.L. - Transformation of chloral to dichloro-acetic acid and its esters.
Chem. Industr., 1960, 718-719.
33. SHARDLESS S.K. - Hypnotus and sedation.
In : GOODMAN L.S., GILMAN A. - "The pharmacological basis of therapeutics".
New York, the Mac Millan Company, 1960, 2ème Ed., 133 p.
34. SUND H., THEORELL H. - Alcohol dehydrogenases.
In : BOYER P.D., LARDY H., MYRBACK R. - "The enzymes".
New York, Academic Press, 1963, 2ème Ed., vol. 7, pp. 25-83.
35. VAN DYKE R.A., CHENOWETH M.B. - The metabolism of volatile anesthetics. II - in vitro metabolism of methoxyflurane and halotane in rat liver slices and cell fractions.
Biochem. Pharmacol., 1965, 14, 603-609.

TABLE DES MATIERES

I - INTRODUCTION

II - ETUDE IN VITRO

A/ COMPORTEMENT DE LA MECLORALUREE EN MILIEU ENTERO-GASTRIQUE

1. Protocole
2. Résultats
3. Discussion

B/ ETUDE DE LA TRANSFORMATION IN VITRO DE LA MECLORALUREE

1. Par différents tissus animaux et fractions subcellulaires

a) Protocole :

- α - Préparation des coupes de tissu et fractions subcellulaires
- β - Préparation des solutions
- γ - Incubation
- δ - Dosage

b) Résultats :

- α - Rat
- β - Lapin

2. Par incubation en présence de sang humain

- a) Incubation dans l'hémoglobine humaine
- b) Incubation dans le sérum humain

3. Discussion

C/ ETUDE DES LIAISONS MEDICAMENTS-PROTEINES PAR LA METHODE DE DIALYSE A L'EQUILIBRE

1. Principe de la méthode
2. Protocole

- a) Matériel
- b) Mode opératoire

3. Résultats

- a) Mécloralurée
- b) Chloral
- c) T.C.E.
- d) T.C.A.

4. Conclusion

D/ ACTION DE LA MECLORALUREE ET DU CHLORAL SUR L'OXYDATION DU D.P.N.H.

- 1. Protocole
- 2. Résultats

E/ ACTION DE LA MECLORALUREE SUR LE METABOLISME DE L'ETHANOL

III - ETUDE IN VIVO

A/ ETUDE DE L'ABSORPTION, LA DISTRIBUTION ET L'EXCRETION DE LA MECLORALUREE APRES UNE ADMINISTRATION UNIQUE

- 1. Chez le rat
 - a) Protocole
 - b) Résultats
- 2. Chez l'homme
 - a) Protocole
 - b) Résultats
 - c) Discussion

B/ COMPARAISON DU COMPORTEMENT ET DES TAUX CEREBRAUX DE PRODUITS TRICHOLORES APRES ADMINISTRATION UNIQUE DE LA MECLORALUREE ET D'UNE DOSE EQUIMOLECULAIRE DE CHLORAL

- 1. Chez le rat
 - a) Protocole
 - b) Résultats
- 2. Chez la souris
 - a) Protocole
 - b) Résultats

C/ ETUDE DE LA DISTRIBUTION DES PRODUITS TRICHOLORES APRES ADMINISTRATION
REPETEE

1. Chez la souris

- a) Protocole
- b) Résultats

2. Chez le lapin

- a) Protocole
- b) Résultats

3. Chez l'homme

- a) Protocole
- b) Résultats

IV - ANNEXES

A/ METHODE DE FUJIWARA MODIFIEE

- 1. Principe du dosage
- 2. Mode opératoire

B/ PREPARATION DES ECHANTILLONS

- 1. Préparation des échantillons d'organes
- 2. Préparation des échantillons de sérum
- 3. Préparation des échantillons d'urine
 - a) sans hydrolyse enzymatique
 - b) hydrolyse à l'aide de la β -glucuronidase
- 4. Préparation des échantillons de bile

C/ ULTRA-CENTRIFUGATION

V - CONCLUSIONS

VI - BIBLIOGRAPHIE

Vu : Le Président de Thèse
Monsieur le Professeur D.J. DUCHE

Vu : Le Doyen de la Faculté
Monsieur le Professeur J. FREZAL

Vu et permis d'imprimer
Le Recteur de l'Académie de Paris
Monsieur R. MALLET

